

**MÍRIAM PERLINGEIRO BELTRAME**

**AVALIAÇÃO DAS GLICOPROTEÍNAS PLAQUETÁRIAS  
NA SÍNDROME DE BERNARD-SOULIER E  
TROMBASTENIA DE GLANZMANN**

Dissertação apresentada como requisito parcial à  
obtenção do grau de Mestre no Programa de Pós  
Graduação em Medicina Interna, Setor de Ciências  
da Saúde, Universidade Federal do Paraná

Orientador: Prof. Dr. José Zanis Neto  
Co-Orientador: Prof<sup>ª</sup>. Mariester Malvezzi

**CURITIBA**

**2004**

Beltrame, Míriam Perlingeiro

Avaliação das glicoproteínas plaquetárias na Síndrome de Bernard-Soulier e trombastenia de Glanzmann / Míriam Perlingeiro Beltrame.– Curitiba, 2004.

ix, 104f. : il.

Dissertação (Mestrado em Medicina Interna) – Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. José Zanis Neto

Co-orientador: Profª Marister Malvezzi

1.Síndrome de Bernard-Soulier.2.Glicoproteínas de membrana de plaquetas.3.Trombastenia. I.Título. NLM  
WH 310

Dedico este trabalho

Ao Paulo, meu marido, à Mônica, ao Marcelo e Gustavo, meus filhos, que souberam compreender a importância deste momento na minha vida.

À minha mãe, Olga, que me direcionou e nunca mediu esforços para me ensinar a ser o que sou.

ii

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Prof. Dr. José Zanis Neto, orientador desta dissertação, a quem devo a grande oportunidade de desenvolver este estudo. Minha grande consideração e respeito.

À Prof<sup>a</sup> Mariester Malvezzi, co-orientadora, por toda sua dedicação, incentivo e ajuda inestimável.

Ao Prof. Dr. Ricardo Pasquini, por compartilhar o seu conhecimento durante a pesquisa.

À minha irmã Rita Perlingeiro Kyba, minha gratidão por seu incentivo, orientações e apoio.

Às colegas de trabalho, Isabel, Eliana, Mari, Rosana, Leila e Noeli, pela compreensão no dia-dia, e ao residente Eduardo pela sua colaboração e presteza na procura de pacientes para a pesquisa..

A toda a equipe da coleta interna, externa e do Banco de Sangue do Hospital de Clínicas da UFPR, pela dedicação e paciência na coleta das amostras dos pacientes e controles normais.

A toda equipe do Ambulatório de Hematologia, Adulto e Pediatria, do Hospital de Clínicas da UFPR.

A toda a equipe do laboratório de Hematologia do Hospital de Clínicas pela atenção, apoio e presteza na realização dos hemogramas e testes de coagulação.

Aos Professores Dr. Rogério Andrade Mulinari, Coordenador do Curso de Pós-Graduação em Medicina Interna da UFPR, na ocasião do meu ingresso, e Dr. José Gastão Rocha de Carvalho, atual coordenador, pela oportunidade da realização deste trabalho.

À Valéria A. Knapp e Lúcia Lemiska, secretárias do Curso de Pós- Graduação

iii

em Medicina Interna da UFPR, pela ajuda durante todo percurso deste estudo.

À Unidade de estatística, representado pelo Prof. Ari Saba e Márcia Olandoski., pela ajuda para a realização de pesquisas estatísticas paralelas a este estudo.

À Sr<sup>a</sup>. Áurea Maria Costin e Sr. Marcelo José Schnaider, pela editoração.

À direção do Laboratório da Santa Casa pela oportunidade de realizar o exame de agregação plaquetária em três pacientes e permitir a coleta e o congelamento das amostras dos pacientes com Síndrome de Bernard-Soulier. Agradeço em especial à Farm. Bioq. Cintia Pelissari, responsável pelo setor de Hematologia deste laboratório.

A Dr<sup>a</sup>. Margaret Ozelo, responsável pelo laboratório de Hemostasia da UNICAMP, pela seriedade, dedicação e oportunidade na realização de exames complementares como Fator VIII, Fator de Von Willebrand e Cofator da Ristocetina.

À Hematologia do Hospital Infantil Pequeno Príncipe, por ceder pacientes para o estudo.

Ao Hospital Evangélico, por ceder um paciente para o estudo.

À empresa Ambriex, representante da Becton & Dickinson, pela doação dos anticorpos monoclonais CD42a e CD42b.

À empresa Biogen, representante da Dako, pela doação do anticorpo monoclonal CD9.

À empresa Centro Químico de Campinas-CQC, representante da Coulter, pela doação do anticorpo monoclonal CD41a.

A todos os amigos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho, expresso meu sincero reconhecimento e gratidão.

Em especial, a todos os pacientes e seus familiares que colaboraram nesta pesquisa, minha eterna gratidão.

Cristo não perguntará por quantas  
coisas houvermos feito, mas por  
quanto amor houvermos posto em  
nossos atos.

*Madre Thereza de Calcutá*

## SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS .....	viii
LISTA DE TABELAS.....	ix
LISTA DE FIGURAS .....	xi
RESUMO .....	xii
ABSTRACT .....	xiii
<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>2 CASUÍSTICA E MÉTODOS.....</b>	<b>13</b>
2.1 CASUÍSTICA .....	13
2.1.1 Dos pacientes.....	13
2.1.2 Dos controles.....	14
2.2.1 Análise morfológica.....	15
2.2.2 Testes funcionais da hemostasia primária .....	15
2.2.3 Avaliação da coagulação sanguínea .....	16
2.2.4 Avaliação quantitativa e funcional do fvw .....	17
2.2.5 Imunofenotipagem plaquetária.....	18
2.3 ANÁLISES ESTATÍSTICAS .....	19
2.3.1 Forma de realização do estudo .....	19
2.3.2 Testes estatísticos .....	19

2.3.2.1 Variáveis quantitativas.....	20
2.3.2.2 Variáveis nominais dicotômicas.....	20
<b>3 RESULTADOS</b> .....	21
3.1 DADOS CLÍNICO-LABORATORIAIS.....	21
3.2 VARIÁVEIS QUANTITATIVAS.....	22
3.3 VARIÁVEIS NOMINAIS DICOTÔMICAS.....	35
<b>4 DISCUSSÃO</b> .....	47
4.1 SIINDROME DE BERNARD-SOULIER.....	48
4.2 TROMBASTENIA DE GLANZMANN.....	53
<b>5 CONCLUSÃO</b> .....	55
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	56
<b>APÊNDICES</b> .....	70
<b>ANEXOS</b> .....	104

## LISTA DE ABREVIATURAS

AcMo	- ANTICORPO MONOCLONAL
ADP	- ADENOSINA DIFOSFATO
APC	- ALOFICOCIANINA
ATP	- ADENOSINA TRIFOSFATO
$\beta$ -TG	- TROMBOGLOBULINA $\beta$
c-MPL	- PROTO-ONCOGENE CLONADO EM MURINOS E HUMANOS DE VÍRUS DE LEUCEMIA MIELOPROLIFERATIVA
CD	- CLUSTER OF DIFFERENTIATION
COOH	- PORÇÃO CARBOXI TERMINAL DA CADEIA $\gamma$
DO	- DENSIDADE ÓTICA
FAP	- FATOR ATIVADOR PLAQUETÁRIO
FP4	- FATOR PLAQUETÁRIO-4
FITC	- ISOTIOCIANATO DE FLUORESCÉINA
Fl	- FENTOLITRO
FSC	- FORWARD SCATTER (TAMANHO)
FvW	- FATOR DE von WILLEBRAND
GM-CSF	- FATOR ESTIMULADOR DE COLÔNIAS GRANULÓCITO/MACRO-FAGO
GP	- GLICOPROTEÍNA
ICAM	- MOLÉCULA DE ADESÃO INTRACELULAR
IL	- INTERLEUCINA
IP	- IODETO DE PROPÍDIO
KDa	- KILO DALTON
LAMP	- PROTEÍNA DE MEMBRANA ASSOCIADA A LISOSSOMA
MHC	- COMPLEXO MAIOR DE HISTOCOMPATIBILIDADE
N -TERMINAL	- PORÇÃO NITROGÊNIO DA CADEIA TERMINAL $\alpha$
PCR	- REAÇÃO DA POLIMERASE EM CADEIA

PE	- FICOERITRINA
PECy5	- FICOERITRINACIANINA 5
PerCP	- PROTEÍNA CLOROFILA PERIDININA
PRP	- PLASMA RICO EM PLAQUETAS
PPP	- PLASMA POBRE EM PLAQUETAS
PBS	- TAMPAO FOSFATO
PGI2	- PROSTACICLINA
RNA	- ÁCIDO RIBONUCLEICO (ARN)
SCA	- SISTEMA CANALICULAR ABERTO
SSC	- SIDE SCATTER (GRANULOSIDADE E COMPLEXIDADE NUCLEAR+)
TP	- TEMPO DE PROTROMBINA
TPO	- TROMBOPOETINA
TS	- TEMPO DE SANGRAMENTO
TPA	- TEMPO DE TROMBOPLASTINA PARCIAL ATIVADA
TT	- TEMPO DE TROMBINA

vii

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - DADOS CLÍNICO-LABORATORIAIS DOS PACIENTES COM SBS E TG.....	21
TABELA 2 – ANÁLISE MOFOLÓGICA.....	22
TABELA 3 - AVALIAÇÃO DO NÚMERO DE PLAQUETAS/ $\mu$ L.....	22
TABELA 4 - AVALIAÇÃO DO VOLUME PLAQUETÁRIO MÉDIO/FL.....	23

## VARIÁVEIS QUANTITATIVAS

TABELA 5 - ANÁLISE DA FLUORES. DO ACO CD9 (ADULTO).....	24
TABELA 6 - ANÁLISE DA FLUORES. MÍNIMA-CD42a (ADULTO).....	24
TABELA 7 - ANÁLISE DA FLUORES. MÁXIMA –CD36 (ADULTO).....	25
TABELA 8 - ANÁLISE DA FLUORES.MÍNIMA-CD61 (ADULTO).....	26
TABELA 9 - ANÁLISE DA FLUORES. MÁXIMA -CD61 (ADULTO).....	26
TABELA 10 - ANÁLISE DA FLUORES. MÉDIA- CD61 (ADULTO).....	26
TABELA 11-ANÁLISE DA FLUORES. MÍNIMA CD41a (ADULTO).....	27
TABELA 12 – ANÁLISE DA FLUORES. MÁXIMA CD41a (ADULTO)....	27
TABELA 13 - ANÁLISE DA FLUORES.MÉDIA-CD41a (ADULTO).....	27
TABELA 14 - ANÁLISE DO TEMPO DE PROTROMBINA (ADULTO).....	28
TABELA 15 - ANÁLISE DO TEMPO DE TROMBOPLASTINA (AD.).....	29
TABELA 16 - AVALIAÇÃO DO NÚMERO DE PLAQUETAS / $\mu$ L .....	30
TABELA 17 - AVALIAÇÃO DO VOLUME PLAQUETÁRIO MÉDIO/FL.....	30
TABELA 18 - ANÁLISE DA FLUORES. MÉDIA-CD9 (CRIANÇA).....	31
TABELA 19 - ANÁLISE DA FLUORES. MÉDIA-CD42a.....	31



TABELA 20 - ANÁLISE DA FLUORES. MÍNIMA-CD42b (CRIANÇAS).....	31
TABELA 21 - ANÁLISE DA FLUORES.MÁXIMA-CD61 (CRIANÇAS).....	32
TABELA 22 - ANÁLISE DA FLUORES. MÉDIA-CD61 (CRIANÇAS).....	32
TABELA23 - ANÁLISE DA FLUORES. MÍNIMA-CD41a (CRIANÇAS).....	33
TABELA24-ANÁLISEDAFLUORES. MÁXIMA- CD41a (CRIANÇAS).....	33
TABELA 25 - ANÁLISE DA MÉDIA DA FLUORES.-CD41a(CRIANÇAS).....	33
TABELA26-AVALIAÇÃO DO TEMPO DE PROTROMBINA (CRIANÇAS).....	34
TABELA27-AVALIAÇÃODOTEMPODETROMBOPLASTINA (CRIANÇAS)...	34

## VARIÁVEIS NOMINAIS DICOTÔMICAS

TABELA28-TEMPO DE SANGRAMENTO- (ADULTOS).....	35
TABELA29-CD9-FLUORESCÊNCIA-(ADULTOS).....	36
TABELA30-CD42a- FLUORESCÊNCIA-(ADULTOS).....	36
TABELA31-CD42bFLUORESCÊNCIA-(ADULTOS).....	37
TABELA32-CD61FLUORESCÊNCIA-(ADULTOS)-.....	37
TABELA33-CD41aFLUORESCÊNCIA-(ADULTOS).....	38
TABELA34-CD42a ANÁLISE PERCENTUAL (ADULTOS).....	38
TABELA35-CD42b ANÁLISE PERCENTUAL (ADULTOS).....	39
TABELA36-CD61ANÁLISE PERCENTUAL (ADULTOS).....	39
TABELA37-CD41aANÁLISE PERCENTUAL (ADULTOS).....	40
TABELA38-FATORVIII (ADULTOS).....	40
TABELA39-FATORDEVON WILLEBRAND (ADULTOS).....	41
TABELA40-COFATORDARISTOCETINA (ADULTOS).....	41
TABELA41-TEMPODESANGRAMENTO (CRIANÇAS).....	42
TABELA42-CD9FLUORESCÊNCIA (CRIANÇAS).....	42
TABELA43-CD42a FLUORESCÊNCIA (CRIANÇAS).....	42
TABELA44-CD42bFLUORESCÊNCIA (CRIANÇAS).....	43
TABELA45-CD42a ANÁLISE PERCENTUAL (CRIANÇAS).....	43
TABELA46-CD42b ANÁLISEPERCENTUAL (CRIANÇAS).....	44
TABELA47-FATORVIII (CRIANÇAS).....	44
TABELA 48 - FATOR DE VON WILLEBRAND (CRIANÇAS).....	44
TABELA 49 - COFATOR DA RISTOCETINA (CRIANÇAS).....	45

**LISTA DE FIGURAS**

FIGURA 1 - INTENSIDADE DE FLUORESCÊNCIA MÍNIMA DE CD42a- ADULTOS.....	24
FIGURA 2 - INTENSIDADE DE FLUORESCÊNCIA MÍNIMA DE CD61- ADULTOS.....	26
FIGURA 3 - INTENSIDADE DE FLUORESCÊNCIA MÁXIMA DE CD61- ADULTOS.....	26
FIGURA 4 - INTENSIDADE DE FLUORESCÊNCIA MÍNIMA DE CD41a- ADULTOS.....	27
FIGURA 5 - INTENSIDADE DE FLUORESCÊNCIA MÁXIMA DE CD41a- ADULTOS.....	28
FIGURA 6 - INTENSIDADE DE FLUORESCÊNCIA MÍNIMA DE CD42b- CRIANÇAS.....	32
FIGURA 7 - INTENSIDADE DE FLUORESCÊNCIA MÁXIMA DE CD61- CRIANÇAS.....	33
FIGURA 8 - INTENSIDADE DE FLUORESCÊNCIA MÁXIMA DE CD41a- CRIANÇAS.....	34
FIGURA 9 - GRUPO SBS-ADULTOS X CONTROLE.....	45
FIGURA. 10 - GRUPO BSS CRIANÇA X CONTROLE.....	46

x

## RESUMO

Dentro das doenças hemorrágicas hereditárias autossômicas recessivas, a Síndrome de Bernard-Soulier e a Trombastenia de Glanzmann são as mais comuns. A Síndrome de Bernard-Soulier (SBS) é uma doença causada pela deficiência ou diminuição do complexo GPIb $\alpha$ /GPIX (CD42b/CD42a), que neste estudo revelou ter padrões de expressões diferentes. O objetivo deste estudo foi avaliar o grau de expressão das glicoproteínas GpIb, GpIIb, GpIIIa e GpIX., por citometria de fluxo. No grupo dos adultos, dos nove pacientes, dois mostraram ausência de CD42b e CD42a; um apresentou diminuição no grau de expressão apenas do CD42b; um mostrou diminuição no grau de expressão dos CD42a e CD42b e cinco pacientes foram normais, quando comparado ao grupo controle. No grupo das crianças, dos seis pacientes; um mostrou ausência de CD42a e CD42b; dois apresentaram diminuição da intensidade de fluorescência de CD42b; um mostrou diminuição do percentual de positividade com os marcadores CD42a e CD42b, porém com fluorescências normais; um apresentou diminuição do percentual de positividade com o marcador CD42a e fluorescências normais e um paciente foi normal, quando comparado ao grupo controle. Assim, anormalidade de um único componente (GPIb $\alpha$  ou GPIX) altera a expressão do complexo e causa heterogeneidade na expressão destas glicoproteínas. A Trombastenia de Glanzmann (TG), causada pela deficiência ou diminuição do complexo GPIIb/GPIIIa. As análises de cinco pacientes adultos revelaram padrões de expressões diferentes. Quatro pacientes foram anormais; um paciente mostrou ausência de CD61 e CD41; um paciente apresentou deficiência de CD61; dois pacientes mostraram deficiência de CD41a e um paciente apresentou expressão normal de CD41 e CD61, quando comparado ao grupo controle. Os achados indicam que os efeitos causados pelas alterações das glicoproteínas da membrana plaquetária, mostrados pelos diferentes graus de fluorescência através da citometria fluxo, são responsáveis pelos fenótipos diferenciados nas doenças Bernard-Soulier e Trombastenia de Glanzmann.

Among the autosomal recessive bleeding disorder, the Syndrome of Bernard-Soulier and Glanzmann's Thrombasthenia are most common. The Syndrome of Bernard-Soulier (SBS) is caused by a deficiency or reduction of the GPIIb/IIIa complex (CD42b/CD42a), which in this study we observed to be expressed in different patterns in SBS patients. The purpose of this study was to evaluate the degree of the expression of the glycoproteins GPIIb/IIIa, GPIIb, GPIIIa and GPIIX, by flow cytometry. In the group of adults, when CD42b/CD42a was analyzed by flow cytometry, from a total of nine patients, two showed absence of CD42b and CD42a; one presented reduction in the level of expression only for CD42b; one showed reduction at the levels of expression of both CD42a and CD42b and five patients were normal, when compared to controls. In the group of children, from a total of six patients; one showed absence of CD42a and CD42b; two presented reduction of the intensity of fluorescence of CD42b; one showed reduction of the percentage of positive cells for CD42a and CD42b while presenting normal fluorescence; one presented reduction of the percentage of positive cells for the CD42a marker and normal fluorescence and one patient was normal, when compared with the control group. Thus, abnormality of an only component (GPIIb or GPIIIa) modifies the expression of the complex and results in heterogeneity in the expression of these glycoproteins. The Thrombasthenia of Glanzmann (GT) is caused by a deficiency or reduction of the GPIIb/GPIIIa complex. The analyses of five adult patients also demonstrated expression in different patterns. Four patients were abnormal; one patient showed absence of CD61 and CD41; one patient presented CD61 deficiency; two patients had shown deficiency of CD41a and one patient presented normal expression of CD41 and CD61, when compared to controls. These findings indicate that the effect caused by the alterations of glycoproteins on the membrane of platelets, shown here by the different degrees of fluorescence through flow cytometry analyses, are responsible for the differentiated phenotypes in Bernard-Soulier and Glanzmann's Thrombasthenia diseases.

# 1 INTRODUÇÃO

Nos seres humanos, durante a vida pós-natal, as células sangüíneas são produzidas na medula óssea (MARTIN, 1990). Estes elementos sangüíneos originam-se da célula denominada célula tronco, que possui a capacidade de renovação própria e de diferenciação em todas as linhagens hematopoéticas. Esta seleção é realizada por mecanismos reguladores intrínsecos, através de fatores de crescimento e maturação específicos.

A seqüência de maturação da linhagem megacariocítica é formada por megacarioblasto, megacariócito maduro e plaqueta. O termo megacariócito foi utilizado pela primeira vez em 1906 (WRIGHT, 1906). São células grandes, poliplóides, com diâmetro e volume aproximados de 20 a 25µm e de 4.700 fentolitros (fL) respectivamente (KUTER, 2001). Amadurecem através de várias replicações nucleares em um citoplasma comum (endomitose), resultando na formação de núcleo multilobular. Quando a maturação é completa, com pico de ploidia (replicação do DNA) em torno de 16-32 N, ocorre a fragmentação do citoplasma, com a produção de 1.000 a 3.000 plaquetas, em forma discóide e anucleadas (HICKERSON; BODE, 2002; SCHUMAN, 2000). O tempo necessário para a diferenciação do precursor em plaqueta é de 4–5 dias. A identificação das plaquetas como um corpúsculo sangüíneo foi descrito em 1882, pela primeira vez, por Julius Bizzozero e relatada a sua importância para a formação do tampão hemostático e em 1888, por Eberth e Schimmelbusch (Bizzozero <sup>1</sup>, citado por GAETANO, 2001, p.349). Em meados de 1906, Homer Wright correlacionou as plaquetas aos megacariócitos (WRIGHT, 1906).

As plaquetas são liberadas na circulação através dos sinusóides medulares, onde 70% permanecem na circulação sangüínea e 30% migram para o baço (KUTER et al., 2001). Diariamente são produzidas  $1 \times 10^{11}$  plaquetas, possuem vida média de 7-10 dias, sendo que algumas são utilizadas para recuperar lesões vasculares mínimas que ocorrem na vida diária e outras morrem por apoptose, sendo removidas pelas células

do sistema retículoendotelial no baço e fígado. O volume plaquetário médio (VPM) é de aproximadamente de 6-8 fL (GILES, 1981; ZUCKER-FRANKLIN, 2000). Tal valor pode aumentar em situações de estresse da trombopoese, onde as plaquetas mais jovens de maior tamanho, são liberadas na circulação. Este processo também pode ocorrer nas doenças onde há defeito plaquetário. Para que as plaquetas possam exercer a sua função, é necessário um número adequado das mesmas, que em condições normais é de 150.000 a 450.000/ $\mu$ L; além de um conjunto de outros fatores como grânulos estocados, proteínas, receptores de membrana, íons cálcio e condições de pH e temperatura.

A produção de plaquetas é regulada quase que totalmente pela quantidade de trombopoetina (TPO) circulante, cuja síntese ocorre no fígado e, em menor quantidade, nos rins. Para exercer sua função, a TPO liga-se à proteína de membrana, denominada c-Mpl (CD110), a qual encontra-se presente nas células progenitoras hematopoéticas, precursores de megacariócitos e plaquetas (KUTER; BEELER; ROSENBERG, 1994; VIGON et al., 1992). Os níveis de TPO são determinados pela massa de plaquetas circulantes. Outros fatores de crescimento também estão envolvidos neste processo, como as interleucinas, IL-1, IL-3, IL-6, IL-11 e o GM-CSF (fator estimulador de colônias granulócito/macrófago) (CARVER-MOORE et al., 1996; KAUSHANSKY, 1995).

A estrutura da plaqueta é complexa, formada de membrana plasmática, citoesqueleto, organelas e o sistema de membrana, constituído este por um sistema canalicular aberto, que liga o citoplasma à membrana plasmática (ITALIANO et al., 1999).

A estrutura trilaminar da membrana é formada de dupla camada de fosfolipídios distribuídos assimetricamente, estando presentes colesterol, glicolipídios e glicoproteínas (WHITE, 1993). Os fosfolipídios possuem carga negativa e estão capacitados para acelerar muitas etapas da coagulação, assim como, atuar como substrato inicial para que as enzimas plaquetárias produzam tromboxane A<sub>2</sub>, um importante produto da ativação plaquetária e fator ativador plaquetário (FAP). Além

das glicoproteínas de adesão e agregação, as plaquetas expressam os antígenos do sistema MHC, o Complexo Maior de Histocompatibilidade de Classe I, bem como do Sistema ABO do grupo sanguíneo (WALSH et al., 1994; BUSSEL; KUNICK; MICHELSON, 2000).

O citoesqueleto é constituído de membrana, microtúbulos e microfilamentos. Estes elementos sustentam a forma discóide, bem como o sistema de contração, que após a ativação plaquetária, permite a mudança na forma, através da emissão de pseudópodos, contração interna e liberação dos constituintes. As glicoproteínas de membrana GPIb e GPIIb/IIIa, apresentam prolongamentos intracitoplasmáticos que estão em contato direto com o sistema contrátil intraplaquetário, como a proteína de membrana actina (FOX; AGGERBECK; BERNDT, 1988; PAINTER; PRODOUZ; GAARDE, 1985). A conexão da membrana plaquetária ao citoesqueleto é via GPIb. Esta glicoproteína interage com o ácido siálico e a redução da quantidade desta GP, resulta na redução do ácido siálico e diminuição da sobrevivência das plaquetas, o que pode explicar a trombocitopenia nestes pacientes. A morfologia aumentada das plaquetas é explicada pela perda ou disfunção do complexo GPIb/GPIX/GPV (FOX, AGGERBECK, BERNDT, 1988; COHN, 1997; LOPEZ et al., 1998; MHAWECH, SALEEM, 2000, KUNISHIMA; KAMIYA; SAITO, 2002).

As organelas são formadas por lisossomas, peroxissomas, corpos densos, grânulos  $\alpha$ , mitocôndria, partículas de glicogênio, ribossomas e RNA mensageiro. Os grânulos densos contêm adenosina difosfato (ADP), adenosina trifosfato (ATP), íons cálcio, magnésio e aminas vasoativas como a serotonina (HOLMSEN; WEISS 1979). Na superfície da membrana dos corpos densos, estão presentes glicoproteínas envolvidas na adesão e agregação plaquetária, como GPIV, LAMP-2, GPIIa (CD62P, P-Selectina), GPIIb/IIIa, e GPIb/IX, as quais também estão presentes na membrana plasmática, membrana dos grânulos  $\alpha$  e lisossomas (TANDON et al., 1989; McEVER, 1991; GOUGH; FAMBROUGH, 1997; PLOW; MARK; GINSBERG; 2000; PARISE et al., 2001).



Os grânulos  $\alpha$  são os mais abundantes nas plaquetas, constituídos de Fator Plaquetário-4 (FP4),  $\beta$ - Tromboglobulina ( $\beta$ -TG), glicoproteínas adesivas (fator de von Willebrand, fibrinogênio, fibronectina, trombospondina, vibronectina), fatores da coagulação (fator V, proteína S, fator XI), fatores mitogênicos (fator de crescimento derivado de plaqueta, fator de crescimento de célula endotelial, fator de crescimento epidermal, fator  $\beta$  de transformação e crescimento, albumina, imunoglobulinas, proteínas de membrana específicas como CD62P, CD63), entre outros elementos (RYO et al., 1983; MC LAREN, 1983; KING, 1984; TUSZYNSKI, 1985; FAVA, 1990; BEN-EZRA, 1990; KEN et al., 1994).

Enquanto o conteúdo dos corpos densos é facilmente secretado após a ativação, a liberação dos grânulos  $\alpha$  requer alta concentração dos agonistas e a secreção dos grânulos lisossomais somente ocorre com potentes agentes ativadores, como a trombina ou altas concentrações de colágeno (PARISE et al., 2001).

Finalmente, o sistema de membrana, também chamado de sistema canalicular aberto, são invaginações da parede celular semelhante à esponja, através do qual as plaquetas secretam as substâncias durante a reação de liberação para manutenção da hemostasia.

A hemostasia é formada por um sistema complexo de componentes, com a finalidade de manter o fluxo vascular livre de coágulos, permitindo simultaneamente, a rápida formação de um tampão para bloquear rupturas ou outras formas de agressão aos vasos sanguíneos (KROLL et al., 1996).

A integridade da parede do vaso depende da integridade dos componentes celulares, assim como, da composição e organização da matriz extracelular. O endotélio íntegro isola as plaquetas sanguíneas e as proteínas da coagulação dos componentes subendoteliais, altamente trombogênicos. As células endoteliais cobrem toda a parede do vaso e são particularmente importantes neste processo, porque têm íntima associação com o fluxo sanguíneo, apresentando trombareguladores precoces como o óxido nítrico, prostaciclina (PGI<sub>2</sub>), ambos potentes vasodilatadores e

inibidores da agregação; trombareguladores tardios como a endotelina, antitrombina III, proteoglicanas, proteínas C e S, inibidor do fator tecidual do sistema fibrinolítico e os trombareguladores inflamatórios representados pelas selectinas, moléculas de adesão celular, inibidor do fator tecidual e proteínas C e S (MONCADA; PALMER; HIGGS, 1991; HARMENING; LEMERY, 1997; CINES et al., 1998).

Em condições normais, as plaquetas circulam no sangue periférico e de forma geral não interagem umas com as outras ou com outros tipos celulares.

Quando expostas a um estímulo apropriado, podem passar rapidamente do estado não adesivo para o estado adesivo. Nesta situação, as plaquetas perdem a forma discóide, tornam-se alongadas, emitem pseudópodos e eliminam o conteúdo das organelas. A ruptura no tecido endotelial expõe constituintes da matriz, incluindo uma variedade de proteínas de adesão, como o fator de von Willebrand, o qual é complexado ao colágeno na parede do vaso e concomitantemente liga-se a receptores específicos da superfície das plaquetas, como o complexo GPIb/V/IX, formando uma ponte entre o colágeno e as plaquetas, conseqüentemente ativando o complexo GPIIb/IIIa ( $\alpha$ IIb $\beta$ 3). Além destas glicoproteínas, o colágeno liga-se diretamente ou indiretamente as GPIaIIa ( $\alpha$ 2 $\beta$ 1), GPIV e GPVI (NURDEN et al., 1981; ESCOBAR; WHITE, 1993; RINDER, 1997; RUGGERI, 1997; ROEST et al., 2000).

Concomitantemente, as plaquetas encontram agonistas como o ADP, serotonina, epinefrina, prostaglandina, tromboxane A<sub>2</sub> e outros elementos do micro-ambiente, que podem desencadear a secreção plaquetária, resultando na liberação do conteúdo dos grânulos que estão estocados e favorecendo as propriedades de adesão. Este processo é reversível e é o primeiro passo para a agregação, uma vez que as plaquetas ativadas expõem sítios de ligação do complexo GPIIbIIIa ao fibrinogênio (WENCEL-DRAKE et al., 1986). A interação das plaquetas com o colágeno envolve primeiramente adesão e subseqüentemente ativação, conduzindo à segunda fase de adesão, secreção, e por último a agregação plaquetária (RUGGERI, 1997). Outros mecanismos e receptores podem estar envolvidos nestes processos (KEHREL et al., 1998).

No processo de agregação (interação plaqueta-plaqueta), ocorre aumento na concentração de ADP até um ponto crítico, que torna o mecanismo irreversível. Há a formação de um tampão efetivo, que fecha a parede do vaso lesado, evitando a perda sangüínea excessiva. As respostas de secreção, adesão e agregação são essenciais para a função hemostática. Esta reação plaquetária ocorre minutos após a lesão e é denominada hemostasia primária. Quando há poucas plaquetas ou quando não são funcionantes, esta fase é dificultada, o que pode resultar em distúrbios hemorrágicos. Por outro lado, uma excessiva ativação plaquetária é responsável por uma variedade de fenômenos trombo-embólicos, especialmente nas artérias.

Os granulócitos e linfócitos T também se aderem às plaquetas e ao endotélio através das moléculas de adesão (P-selectina e ICAM-1) e contribuem para a resposta inflamatória local (ISREALS et al., 1992; KUNZENDORF et al., 1993, WANG, 2001).

Simultaneamente, ocorre a liberação de fatores teciduais na região da lesão, que associados aos fatores plaquetários, ativam a seqüência da coagulação, culminando na formação da trombina, que por sua vez, converte o fibrinogênio em fibrina, formando um tampão permanente, impedindo a hemorragia no local da lesão. Esta fase denomina-se hemostasia secundária.

A adesão e a agregação estão relacionadas com proteínas de membrana específicas, localizadas na superfície das plaquetas, chamadas glicoproteínas e constituídas por GPIb, GPIb $\beta$ , GPIIb, GPIIIa, GPV e GPIX. Através destes receptores, as plaquetas ligam-se ao subendotélio e a superfícies proteicas como fibrinogênio, fibronectina, colágeno, vitronectina, laminina e fator de von Willebrand.

O complexo responsável pela adesão, é formado por quatro subunidades de polipeptídios, GPIb $\alpha$ , GPIb $\beta$ , GPIX e GPV, na proporção de 2:2:2:1 (DU et al., 1987; WU et al., 1997). É membro da família das proteínas de adesão ricas em repetições do aminoácido leucina, que é uma seqüência de 24 aminoácidos conservados por estruturas de dissulfeto de carbono e nitrogênio terminal (YANG, 2000). Estas

glicoproteínas estão envolvidas em diversos processos de sinalização, adesão e maturação celular (LOPEZ, 1994). O GPIb é a maior sialoglicoproteína da membrana plaquetária, com aproximadamente 170kDa (FAUVEL-LAFÈVE. et al., 1993). Possui duas subunidades ligadas por ponte de dissulfeto, GPIb $\alpha$  e GPIb $\beta$ . O sítio de ligação para o fator de von Willebrand e a trombina está localizado na porção N-terminal da cadeia  $\alpha$  (LI. et al., 1995). O GPIX é necessário para a expressão da molécula de GPIb e estabiliza as ligações covalentes entre as subunidades  $\alpha$  e  $\beta$  de GPIb (FOX, 1985; LOPEZ, 1992; SAE-TUNG; JING-FEI, LOPEZ, 1996; DERMOT et al., 1999; FENG, 2000).

O GPV (CD42d) é uma das glicoproteínas mais abundantes, atua como receptor para a trombina e também estabiliza a estrutura do complexo (CLEMETSON; CLEMETSON, 1995). Estudos demonstraram que a ausência de GPV não causa sangramento e permite expressão normal da GPIb $\alpha$  no fator de Von Willebrand (RAMAKRISHNAN et al., 1999; KAHN et al., 1999; RAMAKRISHNAN et al., 2001). As glicoproteínas GPIX e GPV não estão ligadas covalentemente (MODDERMAN et al., 1992; AFSHAR-KHARGHAN.; CRAIG; LOPEZ, 2000; DERMOT.; MORATECK.; MONTGOMERY, 2002). Enquanto as ligações do GPIb e GPIX são covalentes, as ligações entre as proteínas GPIX e GPV não o são (MODDERMAN, 1992; AFSHAR-KHARGHAN; CRAIG; LOPEZ, 2000; DERMOT; MORATECK ; MONTGOMERY, 2002). MOOG et al. (2001) mostraram a interação da GPV com o colágeno, bem como sua interação com a adesão e agregação plaquetária, mas os achados ainda não definem a principal função desta glicoproteína na membrana.

Nas plaquetas, as localizações dos genes das subunidades do complexo GPIb $\alpha$ /GPIb $\beta$ /GPIX/GPV são identificadas como GPIb $\alpha$  no braço curto do cromossoma 17, GPIb $\beta$  no braço longo do cromossoma 22, GPIX e GPV no braço longo do cromossoma 3 (cromossoma3q21 e cromossoma3q29, respectivamente). Muitas mutações das glicoproteínas são relatadas na forma missense, non-sense ou de deleção desses genes. Esta variedade de mutações pode explicar a heterogeneidade

desta síndrome. Em geral os defeitos das glicoproteínas podem estar agrupados em duas situações: na primeira, o defeito pode ocorrer na síntese, no processamento ou na expressão do complexo ou ainda, o defeito pode estar apenas na subunidade GPIIb $\alpha$  que é expressa de forma disfuncional, que perde a capacidade de ligação. Na segunda, a lesão genética pode estar localizada: (1) defeito na GPIIb $\alpha$ ; (2) defeito na GPIIb $\beta$ ; (3) defeito na GPIX e (4) na GPV, nos cromossomos acima mencionados (LOPEZ et al., 1998).

O fator de von Willebrand (fvW) é um multímero com peso aproximado de 260 kDa e o gene está localizado no braço curto do cromossoma 12. Sintetizado nos megacariócitos e células endoteliais; pode ser encontrado nos grânulos  $\alpha$ , plasma e subendotélio, sendo observado transitoriamente no sangue periférico normal (MEYER, GIRMA, 1993; COTRAN; KUMAR; COLLINS, 1999). Após a ligação a componentes do subendotélio, especialmente o colágeno, o fvW sofre mudanças na conformação, que o capacita a ligar-se a GPIIb, através do domínio A1, região esta onde ocorrem reações com ativadores ou moduladores da interação fvW-GPIIb (SADLER, 1991; GIRMA, RIBBA, MEYER, 1995; GOTO et al., 1995; MARIAGRAZIA et al., 2000). É uma proteína que media a adesividade plaquetária e que carrega e estabiliza o Fator VIII (RAVEL, 1995; NURDEN et al., 2000).

O complexo GPIIb/IIIa, pertence à família das integrinas, com peso molecular de aproximadamente 136 kDa, na proporção de 1:1 (PHILIPS et al., 1988). A GPIIb divide-se em GPIIb $\alpha$  (cadeia pesada) e GPIIb $\beta$  (cadeia leve), sendo que esta última ancora o complexo na membrana plaquetária e a primeira, interage com a GPIIIa. Estas glicoproteínas estão presentes na membrana plasmática e na membrana do sistema canalicular aberto (SCA), assim como nos grânulos  $\alpha$  (CRAMER et al., 1990; DRAKE-WENCEL et al., 1986). É a proteína mais abundante da plaqueta e reconhece o fibrinogênio, fator de von Willebrand, fibronectina e a vitronectina através da porção carboxi terminal COOH, na cadeia  $\gamma$  e também pela sequência de aminoácidos arginina-glicina-ácido aspártico na cadeia  $\alpha$  (PLOW et al., 1985; NEWMAN, 1991;

IKEDA et al., 1991). O fibrinogênio liga-se à superfície das plaquetas ativadas e atua como uma ponte entre as plaquetas adjacentes (GARTNER; BENNETT, 1985). O complexo está envolvido na agregação plaquetária e deficiente ou ausente na Trombastenia de Glanzmann (TG) (BAKER, 1997; GONZALEZ-MANCHON et al., 1999; BOUDREAUX; LIPSCOMB, 2001). As glicoproteínas GPIIb/GPIIIa são produtos de genes separados, ambos localizados no cromossoma 17. Estudos indicam que a GPIIb e a GPIIIa devem formar um complexo, após a síntese até receber o processo final e transporte até a membrana plaquetária. A expressão deste complexo na superfície celular, requer ambas glicoproteínas, GPIIb e GPIIIa. Entretanto, a mutação de um ou de outro, conduz a trombastenia (RETZINGER, 2002; HICKERSON; BODE, 2002; KANNAN, 2003).

A glicoproteína IV, possui peso molecular de 88 kDa Não pertence à família das integrinas e está presente na membrana plaquetária, no sistema canalicular aberto e na membrana dos grânulos  $\alpha$ . Esta glicoproteína está presente também nos monócitos, macrófagos, eritrócitos, adipócitos, algumas células epiteliais e endoteliais. Nas plaquetas, esta glicoproteína atua como receptor da trombospondina e do colágeno e tem importante função nos estágios precoces da adesão plaquetária na superfície das células endoteliais (THIBERT et al., 1992; DIAZ-RICART et al., 1996; GOICOEHEAT et al., 2002).

A glicoproteína CD9 (p24), possui peso molecular de 22-27 kDa e pertence à superfamília da tetraspanina. Está presente na membrana das plaquetas, assim como nos linfócitos B e T ativados, precursores das células B, eosinófilos, basófilos, células do músculo cardíaco, cérebro e epitélio (LANZA et al., 1991; SLUPSKY et al., 1997). Estudos com o anticorpo monoclonal anti-CD9 sugerem o envolvimento desta glicoproteína na adesão e na agregação plaquetária (WORTHINGTON; CARROL; BOUCHEIX, 1990; WEI-MIN et al., 2001).

Alterações na formação do complexo GPIb/IX/V resultam em deficiência no mecanismo de adesão, o que conseqüentemente leva ao aparecimento de um processo patológico congênito, denominado Síndrome de Bernard-Soulier (LOPEZ, et al.,

1998; SAVOIA et al., 2001). Neste particular, Jean Bernard e Jean Pierre Soulier foram os primeiros a descrever esta doença, em 1948, ao identificar uma família com distúrbios de sangramento, caracterizada pela presença de plaquetas gigantes e trombocitopenia (BERNARD; SOULIER, 1948; TOMEM et al., 1994). É uma doença autossômica recessiva, freqüentemente associada à consangüinidade e indivíduos heterozigotos são freqüentemente assintomáticos.(ESA, 1994). Esta enfermidade caracteriza-se pela ausência ou redução na expressão do complexo GPIb/IX/V, o que impossibilita a adesão das plaquetas ao fator de Von Willebrand para formar o tampão hemostático (WARE et al., 1990; TAYLOR et al., 2002). Critérios específicos para o diagnóstico da Síndrome de Bernard-Soulier têm sido estabelecidos: (1) Traço autossômico com manifestação clínica combinada em homozigotos, (2) Trombocitopenia discreta ou moderada (com número de megacariócitos normais na medula óssea); (3) Número significativo de plaquetas gigantes ou de diâmetro aumentado no sangue periférico e tempo de sangramento muito prolongado para o grau de trombocitopenia; (4) Ausência de agregação plaquetária em resposta à ristocetina; (5) Agregação normal em resposta ao ADP, colágeno, epinefrina e reduzida pela trombina e (6) Complexo FVIII:fvW normal .

Outra doença congênita associada a hemostasia primária é a Trombastenia de Glanzmann, que foi primeiramente descrita em 1918 por Eduard Glanzmann, como uma “Trombastenia Hemorrágica Hereditária” (GLANZMANN, 1918). É uma doença autossômica recessiva, rara, relacionada à função plaquetária e caracterizada pela ausência ou deficiência do complexo de membrana GPIIb/IIIa (GEORGE; CAEN; NURDEN, 1990; MARKOVITCH, et al., 1998; SHARP; KHANDURI; CHRISTIE, 1998; RICHARD; KLIEGMAN; HAL, 2000).

As doenças estudadas são de transmissão autossômica recessiva. Os distúrbios autossômicos recessivos expressam-se apenas em homozigotos, que, portanto, devem ter herdado um alelo mutante de cada genitor. Eles podem ser transmitidos nas famílias por numerosas gerações sem aparecer na forma homozigótica. A chance de isto acontecer é aumentada se os pais forem aparentados. A consangüinidade dos

genitores de um paciente com um distúrbio genético é uma forte evidência em favor da herança autossômica recessiva nestas doenças (Figura 1) (ROSENBERG et al., 1997).

Este complexo media a agregação das plaquetas ativadas pela ligação ao fibrinogênio, fvW e fibronectina. A incidência é maior em casamentos consangüíneos, principalmente em populações étnicas em que é prevalente este costume (COLLER et al., 1986; GEORGE; CAEN; NURDEN, 1990. Alguns critérios para o diagnóstico de TG são: (1) sintomas hemorrágicos começando na infância; (2) traço autossômico recessivo com manifestação expressa somente em homozigose; (3) tempo de sangramento prolongado; (4) ausência de agregação ao ADP, trombina, colágeno, epinefrina e agregação normal para a ristocetina (NEWMAN et al., 1991; SHARP; KHANDURI; CHRISTIE, 1998; BALDUINI; LOLASCON; SAVOIA, 2002; GEOFFREY; GLADER, 2002; KOTTKE-MARCHANT, 2002).

Testes rotineiramente utilizados em laboratório de hemostasia, tais como Tempo de Protrombina (TAP), Tempo de Tromboplastina (TTPA) e Tempo de Trombina (TT), não diferenciam estas duas doenças hemorrágicas congênicas, uma vez que estes testes estão relacionadas com a hemostasia secundária.

Comumente, o diagnóstico laboratorial da Síndrome de Bernard-Soulier e Trombastenia de Glanzmann é realizado através do tempo de sangramento, contagem e análise morfológica das plaquetas. Quando a contagem é superior a 90.000/mL, é também possível fazer o estudo da agregação plaquetária. No entanto, estes testes não são suficientes para o diagnóstico das doenças em estudo. Neste sentido, a citometria de fluxo, método utilizado na definição de diversas doenças hematológicas, tais como leucemias, linfomas, hemoglobinúria paroxística noturna, mieloma múltiplo, estudo de subpopulações linfocitárias, etc.; pode servir como uma ferramenta no auxílio diagnóstico da Síndrome de Bernard-Soulier e Trombastenia de Glanzmann. Quando empregado no estudo das plaquetas, tem proporcionado resultados rápidos e precisos (SHAPIRO, 1995; WENCHE et al., 1998; MICHELSON et al., 2000; BODE; HICKERSON, 2002).



A citometria de fluxo utiliza os parâmetros de tamanho (FSC), granulosidade e complexidade nuclear (SSC), para identificar as células sanguíneas, através de anticorpos monoclonais marcados com fluorocromos, direcionados aos antígenos de membrana, citoplasma e núcleo. Uma ampla variedade de fluorocromos está disponível, como o isotiocianato de fluoresceína (FITC), ficoeritrina (PE), proteína clorofila peridina (PerCP), ficoeritrina-cianina 5 (PECy5), aloficocianina (APC) e iodeto de propídio (IP).

No caso das plaquetas, as proteínas (antígenos), denominam-se GpIa-IIa (receptor colágeno), GpIb-V-IX (receptor fvW e trombina), GpIc-IIa (receptor fibronectina), GpIIb-IIIa (receptor fibrinogênio, fvW, fibronectina e vitronectina), GpIV (receptor trombospodina e colágeno), GpVI (receptor colágeno) e CD9 (receptor fibronectina) e fornecem o fenótipo plaquetário (JENNINGS et al., 1986; SCHATTIL; CUNNINGHAM; HOXIE, 1987).

Comercialmente é utilizada a nomenclatura de padronização internacional denomi-

nada - CD (*Cluster of differentiation*), seguida de um número. As plaquetas podem ser avaliadas através da marcação com anticorpos específicos que se ligarão aos antígenos anteriormente citados tais como, CD41a (GpIIb), CD42a (GpIX), CD42b (GpIb $\alpha$ ), CD42c (GpIb $\beta$ ), CD42d (GpV), CD61 (GpIIIa). Há também anticorpos direcionados à membrana plaquetária e que não são de linhagem específica, como CD9, CD31, CD32, CD36 (GpIV), CD62P, CD63, CD107a e CD107b (BARCLAY et al., 1997; ZUCKER-FRANKLIN, 2000).

Outros testes para o estudo da hemostasia nas doenças congênitas hemorrágicas incluem, a pesquisa do fator de von Willebrand, fator VIII, cofator da ristocetina e testes mais sofisticados como o estudo dos multímeros do fator de von Willebrand e a biologia molecular (PCR- reação em cadeia da polimerase), alguns destes realizados neste estudo para complementação diagnóstica.

Estudos como este, comparando a performance da citometria de fluxo com os testes laboratoriais para o auxílio diagnóstico da Síndrome de Bernard-Soulier e Trombastenia de Glanzmann, podem vir a determinar a validade deste método no estudo das doenças congênitas hemorrágicas, permitindo um estudo mais acurado dos pacientes com história de sangramento familiar. A necessidade de auxílio diagnóstico nestas doenças foi o principal interesse nesta pesquisa, uma vez que exames como agregação plaquetária, pesquisa do fator de von Willebrand, cofator da ristocetina e biologia molecular plaquetária – não são realizados neste hospital. Com esta preocupação, a introdução de estudo das glicoproteínas plaquetárias como exame de rotina para os pacientes com suspeita de defeito genético da função plaquetária.

Este trabalho tem por objetivo estudar o grau de expressão das glicoproteínas plaquetárias GpIb, GpIIb, GpIIIa e GpIX, por citometria de fluxo, como método de *screening* na pesquisa das doenças hemorrágicas congênitas na Síndrome de Bernard-Soulier e Trombastenia de Glanzmann.

## **2 CASUÍSTICA E MÉTODOS**

Este estudo teve início após aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, em 27 de Agosto de 2002 (Anexo1), estando registrado no Banco de Pesquisas da UFPR (BANPESQ) sob o número 2002012171. Todos os pacientes concordaram em participar do estudo, assinando o termo de consentimento (Anexo 2). Aos pacientes com idade inferior a 18 anos, foi solicitada a autorização dos pais.

### **2.1 CASUÍSTICA**

#### **2.1.1 Dos pacientes**

Foram admitidos no estudo pacientes com diagnóstico/suspeita de Síndrome de Bernard-Soulier (15) e Trombastenia de Glazmann (5). Os pacientes com suspeita de SBS, apresentavam histórico familiar e/ou história pregressa de sangramento, além da presença de plaquetas de diâmetro aumentado na análise morfológica. Dos pacientes com TG, 4 apresentaram diagnóstico através do teste de agregação plaquetária e o quinto paciente não realizou a agregação, mas relatava história de sangramento desde a infância e plaquetas normais em número e morfologia. Os pacientes vieram do serviço de hematologia (pediatria e adulto) do Hospital de Clínicas e de outros serviços, como o Hospital Infantil Pequeno Príncipe e Hospital Evangélico. Todos os prontuários foram revistos.

Neste estudo houve um caso relatado de casamento consanguíneo, entre primos de primeiro grau (pais do paciente FP) (Figura.11).

Tabela 1 mostra os resultados clínico-laboratoriais dos pacientes SBS e TG. Para os pacientes com SBS, foram pré-requisitos na seleção dos pacientes, o tempo de sangramento, histórico familiar, história pregressa e plaquetas gigantes e/ou diâmetro aumentado, ou pelo menos dois destes dados. Para os pacientes com TG, foram pré-requisitos o tempo de sangramento, histórico familiar, história pregressa e agregação plaquetária, ou pelo menos dois destes dados.

Após a seleção dos pacientes que preenchiam os critérios diagnósticos de SBS e TG, foram realizadas as coletas das amostras dos pacientes e controles e análise dos resultados por citometria de fluxo, no período de março de 2002 a setembro de 2003. Amostras dos pais e irmãos foram coletadas, quando possível. Estes resultados não foram mostrados neste estudo.

Para complementação desta pesquisa, foram realizados os exames de Cofator da Ristocetina, Fator de von Willebrand e Fator VIII, na Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) para uma melhor caracterização dos pacientes em estudo.

### 2.1.2 Dos controles

O grupo controle adulto foi formado por 34 indivíduos normais, doadores de sangue do Biobanco do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná.

O grupo controle infantil foi formado por 15 crianças provenientes da Pediatria/Ortopedia/Traumatologia, em situação de pré-cirurgia.

As análises dos grupos controles foram examinadas simultaneamente quando da análise dos pacientes.

## 2.2 MÉTODOS

Os exames foram realizados em amostras de sangue periférico e coletados como segue:

- Foi utilizado o anticoagulante citrato de sódio 3,8% (Vacutainer-BD) para os exames de contagem de plaquetas, TP, TTPA e citometria de fluxo.
- Foi utilizado o anticoagulante citrato de sódio 0,109 M (Merck) numa proporção de 9mL de sangue periférico para 1mL do anticoagulante, para o estudo da agregação plaquetária.
- Foi utilizado o anticoagulante EDTA (Vacutainer-BD) para o hemograma completo.
- Foram realizadas lâminas, sem anticoagulante, para o estudo da morfologia.

- O tempo de sangramento foi realizado pelos métodos de Ivy e Duke.

### 2.2.1 Análise morfológica

Foi realizada a análise morfológica das plaquetas, bem como dos neutrófilos para avaliar inclusões (Di PUMPO, M.; 2002). Na análise da plaqueta foi considerada gigante, quando o diâmetro se aproximou ao diâmetro da hemácia e plaqueta de diâmetro aumentado quando o tamanho foi um pouco maior que a plaqueta normal . Os grânulos plaquetários foram classificados aleatoriamente por cruces (4+, 3+, 2+, 1+ e 0) (Tabela 2).

### 2.2.2 Testes funcionais da hemostasia primária

- Tempo de sangramento de Ivy – Teste *in vivo*. Incisão padronizada em antebraço mantendo-se a pressão venosa e medida do tempo até cessação do sangramento, espontaneamente, a uma pressão constante de 40 mmHg. Limite fisiológico: 1-7 minutos.
- Tempo de sangramento de Duke - Teste *in vivo*. Incisão padronizada do lobo da orelha e medida do tempo até cessação do sangramento. Limite fisiológico: 1-3 minutos.
- Teste da agregação plaquetária

As amostras foram centrifugadas a 80 ou 100g por 10 minutos para obtenção do plasma rico em plaquetas (PRP). O PRP foi transferido para um tubo de plástico e o restante foi novamente centrifugado a 3.000 rpm por 15 minutos para obtenção do plasma pobre em plaquetas (PPP). A agregação plaquetária foi realizada por turbidimetria, através de sistema ótico, no agregômetro Chrono-log (Havertown, PA, EUA) . Este estudo foi realizado no laboratório da Santa Casa de Misericórdia

Para a realização deste teste utilizou-se um volume de 450 µl de PRP, ao qual foi adicionado ristocetina (Helena Laboratories, Beaumont, Texas França), em uma concentração final de 1,5 mg/ml. De maneira semelhante foram realizados testes de agregação plaquetária do PRP com os agentes agregantes: epinefrina 260 µMol (Sigma, St Louis, MO, EUA); adenosinadifosfato ou ADP 100 µMol (Sigma, St. Loius , MO, EUA).

### 2.2.3 Avaliação da coagulação sanguínea

Para avaliação do estudo da coagulação sangüínea foram realizados o tempo de atividade da protrombina (TP) e o tempo de tromboplastina parcial ativado (TTPA) no coagulômetro da Sysmex CA 1500(Kobe, Japão). O reagente utilizado para o TP foi o Thromborel S e para o TTPA, Actin, conforme descrição do fabricante (Marburg, Alemanha e Kobe, Japão, respectivamente). Os controles normais utilizados foram da marca Control C (Nowark, USA).

### 2.2.4 Avaliação quantitativa e funcional do fator de von willebrand (fvw)

- A quantificação do fator de von Willebrand plasmático foi determinada por ELISA utilizando o anticorpo capturante de coelho anti-fvW humano (Dako A0082, Dinamarca) para a captura do antígeno e o anticorpo de coelho anti-fvW humano conjugado com peroxidase (Dako P226, Dinamarca) marcado para a determinação da quantidade de antígeno do FvW (MAZZANI et al., 2000).
- A determinação da atividade coagulante residual do fator VIII foi realizada pelo ensaio em um estágio, baseado na correção do TTPA de plasma humano artificialmente deficiente em fator VIII (Biomérieux Inc., Carolina do Norte, USA) em aparelho Thrombolyzer® Rack Rotor (Organon Teknika).
- A atividade do cofator da ristocetina (FvW:RCo) induz agregação plaquetária de um pool de células obtidas de indivíduos normais. Nesta técnica foram utilizadas plaquetas liofilizadas (NL Helena Laboratories, Beaumont, TX, EUA) que foram ressuspensas em 5mL de tampão TRIS-salina (TRIS 0,05M, NaCl 0,15M; azida sódica 0,02%), para obtenção de cerca de  $300 \times 10^3$  células/mL. Para a realização da curva de calibração foi utilizado o calibrador S.A.R.P. (*Specialty Assayed Reference Plasma*) – NL Helena Laboratories, Beaumont, TX, USA), nas diluições 1:2; 1:4 e 1:8 em tampão TRIS-salina. Em 400µL das plaquetas obtidas, foram adicionadas 50µL de ristocetina (liofilizadas-NL Helena Laboratories, Beaumont, TX, USA) na concentração de 10mg/mL e 50µL do plasma teste diluído 1:2 e 1:4. As análises foram realizadas no agregômetro PACKS-4 (Helena Laboratories, Beaumont, TX, USA). Os resultados da atividade cofatora de ristocetina foram obtidos a partir da curva de calibração. Foram considerados normais os valores entre 50 e 150% de atividade de acordo com a padronização realizada no Laboratório de Hemostasia do Hemocentro da Unicamp.

### 2.2.5 Imunofenotipagem plaquetária

O plasma rico em plaquetas (PRP) foi obtido pela centrifugação das amostras a 100g por 10 minutos. O PRP foi removido para um tubo de polipropileno (12x75mm), com pipeta de plástico, acima do “buffy coat”. O plasma pobre em plaquetas (PPP) foi obtido pela centrifugação de uma parte do PRP e centrifugado a 1.500g por 15 minutos. As amostras com contagem de plaquetas superior a  $2,5 \times 10^8/\text{mL}$ , foram diluídas com o PPP (McCABE; JENNINGS,1999).

Os anticorpos monoclonais utilizados foram GPIb $\alpha$  (CD42b), GPIX (CD42a), GPIIb (CD41a), GPIIIa (CD61), CD9 e GPIV (CD36). Os anticorpos foram conjugados aos fluorocromos FITC, isotiocianato de fluoresceína e PE, ficoeritrina, para visualização. Os clones estudados foram: P1/33/2 para CD9 FITC (Dako-Carpinteria-Califórnia-USA); CB38(NL07) para CD36 FITC (Pharmingen/Becton & Dickinson -SanDiego-Califórnia-USA); P2 para CD41a PE (Coulter/Immunotech-Marseille-France); ALMA16 para o CD42a FITC (Becton & Dickinson-SanDiego-Califórnia-USA); HIP1 para CD42b FITC (Becton & Dickinson- San Diego-Califórnia-USA); SZ21 para CD61 FITC (Coulter/ Immunotech-Marseille-France) e controle negativo, IgG2a FITC/ IgG1 PE (Coulter/Immunotech-Marseille-France). Estes anticorpos reconhecem os diversos componentes dos complexos em estudo. Para os pacientes com SBS, os controles positivos foram os anticorpos CD9, CD36, CD41a e CD61 e para os pacientes com TG, foram CD9, CD36, CD42a e CD42b. As amostras foram incubadas utilizando 100 $\mu\text{L}$  de PRP para 10 $\mu\text{L}$  de anticorpo monoclonal, conforme descrição do fabricante. As amostras foram incubadas por 15 minutos a temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Foi realizada uma lavagem após a incubação, com PBS contendo 4mmol/L de EDTA, para evitar a formação de agregados plaquetários. A quantificação de cada glicoproteína foi determinada pela aquisição de 20.000 células no citômetro de fluxo da Coulter, EPICS® XL-MCL – System II<sup>TM</sup> Software (Coulter Corporation, Miami, Flórida, USA), seguido da análise



nos programas Listmode e Multigraph. O controle de qualidade utilizado para calibração diária, foi o Flow Check - Coulter.

Os valores das fluorescências individuais dos pacientes e dos controles por citometria de fluxo, bem como os gráficos (FSC x SSC e fluorescências) são mostrados no Apêndice.

## 2.3 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

### 2.3.1 Forma de realização do estudo

Em uma parte deste estudo foram comparados os grupos compostos por adultos normais (Controles), pacientes adultos com SBS e pacientes adultos com TG. Em outra parte do estudo, foram comparados os grupos compostos por crianças normais (Controles) e pacientes crianças com SBS. Não houve paciente criança no grupo TG.

### 2.3.2 Testes estatísticos

Para a comparação de 3 grupos, em relação a variáveis quantitativas, adotou-se o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis. Havendo rejeição da hipótese de igualdade dos 3 grupos, efetuou-se a comparação dos grupos 2 a 2 considerando-se o mesmo teste. Na comparação de proporções, adotou-se o teste exato de Fisher. Em todos os testes, um valor de  $p < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo.

#### 2.3.2.1 Variáveis quantitativas

Para cada uma das variáveis, no estudo de pacientes adultos, testou-se a hipótese nula de resultados iguais da variável em estudo, nos 3 grupos, versus a hipótese alternativa de resultados diferentes. Quando da rejeição da hipótese nula, foram testadas as mesmas hipóteses comparando-se os grupos dois a dois.

No estudo de pacientes crianças, testou-se a hipótese nula de resultados iguais da variável em estudo nos grupos Controle e SBS, versus a hipótese alternativa de resultados diferentes.

#### 2.3.2.2 Variáveis nominais dicotômicas

Em todas as situações, testou-se a hipótese nula de proporções iguais de pacientes com resultado normal nos grupos sob comparação, versus a hipótese alternativa de proporções de diferentes. Nas tabelas abaixo são apresentados os resultados obtidos no estudo.

Cada anticorpo monoclonal foi estudado quanto às variáveis: fluorescência mínima, máxima, média, mediana e desvio padrão nos grupos controle e de pacientes.

Cada grupo apresentou indivíduos com o menor e o maior valor da referida fluorescência (mínima, máxima, média).

### **3 RESULTADOS**

#### 3.1 DADOS CLÍNICO-LABORATORIAIS

Inicialmente são apresentadas as características das populações estudadas com os dados referentes à idade, Volume Plaquetário Médio (VPM), Tempo de Sangramento (TS), Agregação Plaquetária, Tempo de Protrombina (TP), Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada (TTPA) e quadro clínico (histórico familiar, história pregressa e sintomas) (Tabela 1).

A seguir serão mostrados os resultados de citometria de fluxo e dos testes diagnósticos utilizados em relação às variáveis de controles estudadas.

TABELA 1 - DADOS CLÍNICO- LABORATORIAIS DOS PACIENTES COM SBS E TG

Nº	Paciente/ doença	Idade	VPM (fL)	TS (s)	Agr. Plaq.	TP (R)	TTPA (R)	História familiar	Início sintomas (idade)	Sintomas
1	FP/ SBS	38	11,2	> 20	*	1,16	1,00	Sim -irmãos	6 anos	E, G
2	ER/ SBS	3	8,5	20	*	1,03	0,84	Nega	1 ano	E, G
3	RA/ BS	20	10,5	> 20	*	1,07	1,11	Nega	9 anos	E, Q, M
4	AS/ SBS	3	7,2	9	N?	1,10	1,29	Sim – mãe	10 meses	P, Q
5	NR/ BS	7	14,3	3	*	1,02	0,98	Nega	10 meses	P, Q
6	VS/ SBS	22	9,1	7	*	1,15	1,14	Nega	6 anos	E, Q, G
7	DS/ SBS	45	15,2	3	*	1,03		Nega	40 anos	G
8	LB/SBS	6	18,6	5	*	0,98	0,84	Nega	3 anos	E
9	SO/SBS	4	6,5	3	*	1,02	1,08	Sim – pai	1 ano	E
10	DV/SBS	22	10,9	6	D	1,11	1,14	Sim-irmão/vô	6 anos	E, Q
11	SS/SBS	34	8,9	4	*	1,02	1,02	Nega	12 anos	M, Q
12	PS/ SBS	21	7,5	3	*	1,05	0,97	Nega	12 anos	M, Q, P
13	EG/ BS	4	24,6	> 20	*	0,91	0,99	Nega	7meses	Q, G
14	VS/ SBS	18	10,3	7	*	*	*	Nega	2 anos	Q, E
15	BM/ BS	20	7,0	7	*	1,02	0,86	Nega	2 anos	G, E
1	EC/TG	25	*	> 20	D	1,10	1,04	Nega	2 anos	E, M
2	EC/TG	16	7,8	3	D	1,08	1,08	Sim- mãe	2 anos	G, E
3	JÁ/TG	17	6,8	4	D	0,98		Sim-pai	2 anos	P, E
4	MF/TG	14	8,7	9	*	1,11	1,19	Nega	2 anos	P, E
5	AK/TG	13	*	*	D	1,11	1,55	Nega	5 anos	0

0: ausência; N?: análise difícil (para o agonista Ristocetina); D: diminuído (para os agonistas ADP, epinefrina e colágeno); \*: não realizado; E: epistaxe; G: gengivorragia; M: metrorragia; Q: equimoses;

P: petéquias. TP (R= 0,8 - 1,2); TTPA (R= até 1,20).

TABELA 2 - ANÁLISE MORFOLÓGICA

Nº	Paciente/ doença	Plaquetas (tamanho)	Plaquetas (grânulos)	Plaquetas (forma)	Leucócitos (inclusões)
1	FP/ SBS	gigantes	4+	redonda	normal
2	ER/ SBS	gigantes	4+	redonda	normal
3	RA/ BS	gigantes	3+/4+	redonda	normal
4	AS/ SBS	diâm. aumentado	0/2+	várias	normal
5	NR/ BS	gigantes	4+	redonda	normal
6	VS/ SBS				normal
7	DS/ SBS	diâm. aumentado	4+	redonda	normal
8	LB/SBS	gigantes	3+	redonda	normal
9	SO/SBS	raras diâm. aum.	3+/4+	redonda	normal
10	DV/SBS	diâm. aumentado	2+	várias	normal
11	SS/SBS	gigantes	2+/4+	redonda	normal
12	PS/ SBS	gigantes	3+/4+	redonda	normal
13	EG/ BS	gigantes	2+/4+	redonda	normal
14	VS/ SBS	diâm. aumentado	2+/3+	redonda	normal
15	BM/ BS	gigantes	3+/4+	redonda	normal
1	EC/TG	normais	3+/4+	redonda	normal
2	EC/TG	normais	3+/4+	redonda	normal
3	JÁ/TG	normais	3+/4+	redonda	normal
4	MF/TG	normais	3+/4+	redonda	normal
5	AK/TG	normais	3+/4+	redonda	normal

0=ausência de grânulos; 1+ = +; 2+ = ++; 3+ = +++; 4+ = ++++

### 3.2 VARIÁVEIS QUANTITATIVAS

A seguir são esplanados os resultados dos testes estatísticos utilizados em relação às variáveis dos controles estudados.

#### ADULTOS

##### a) Número de plaquetas

TABELA 3- AVALIAÇÃO DO NÚMERO DE PLAQUETAS/ $\mu$ L (ADULTOS)

NºPlaquetas	n	Menor valor	Maior valor	Mediana	Média	Desvio padrão
Controleadulto	34	153.000	387.000	268.500,0	267.058	58.027
SBS adulto	9	3.000	137.000	15.000,00	50.333	56.298
TG adulto	5	149.000	352.000	212.000,0	226.200	75.876

Controle x SBS:  $p=0,0001$

Controle x TG:  $p=0,0775$

## b) Volume plaquetário médio

TABELA 4- AVALIAÇÃO DO VOLUME PLAQUETÁRIO MÉDIO/ fL (ADULTOS)

VPM	n	Menor valor	Maior Valor	Mediana	Média	Desvio padrão
Controleadulto	34	6,20	9,60	7,85	7,95	0,75
SBS adulto	8	7,00	15,20	9,70	9,93	2,55
TG adulto	3	6,80	8,70	7,80	7,77	0,95

Controle x SBS:  $p=0,0162$

Controle x TG:  $p=0,7591$

As tabelas 3 e 4 mostram a diminuição na contagem de plaquetas e aumento do volume plaquetário médio no grupo SBS em relação ao grupo controle. Os valores de VPM encontrados nos pacientes, foram significativamente aumentados quando comparados os dois grupos. Não houve diferença estatisticamente significativa quanto aos pacientes TG.

## c) CD9

TABELA 5 - ANÁLISE DA FLUORESCÊNCIA DO ACMO CD9 (ADULTOS)

CD9MÍN	n	Menor expressão	Maior expressão	Mediana	Média	Desvio padrão
Controle adulto	34	1,96	11,40	6,08	6,04	2,16
SBS adulto	8	0,10	5,86	3,04	2,99	2,07
TG adulto	5	2,52	5,86	5,17	4,64	1,34

Controle x SBS:  $p=0,0023$

Controle x TG:  $p=0,1529$

A análise estatística foi significativa quanto à fluorescência mínima, isto é, a menor expressão antigênica do anticorpo monoclonal CD9, quando comparado o

grupo controle com o grupo de SBS. Não houve diferença estatisticamente significativa quanto aos pacientes TG vs grupo controle (Tabela 5).

#### d) CD42b

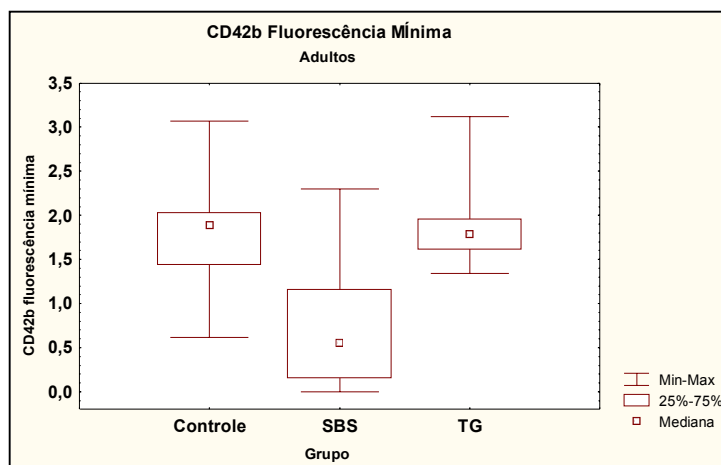
TABELA 6 - ANÁLISE DA FLUORESCÊNCIA MÍNIMA- CD42b (ADULTOS)

CD42bMÍN	n	Menor Expressão	Maior expressão	Mediana	Média	Desvio padrão
Controle adulto	34	0,62	3,07	1,89	1,80	0,62
SBS adulto	9	0,00	2,30	0,56	0,77	0,78
TG adulto	5	1,34	3,12	1,79	1,96	0,69

Controle x SBS:  $p=0,0016$

Controle x TG:  $p=0,9162$

FIGURA 1 - INTENSIDADE DE FLUORESCÊNCIA MÍNIMA DE CD42b-ADULTOS



A Tabela 6 e Figura 1 mostram a alteração da fluorescência do anticorpo monoclonal CD42b nos pacientes com SBS. Houve diminuição da intensidade de fluorescência mínima. Não houve diferença entre os pacientes TG.

e) CD36

TABELA 7- ANÁLISE DA FLUORESCÊNCIA MÁXIMA-CD36 (ADULTOS)

CD36MÁX	n	Menor expressão	Maior expressão	Mediana	Média	Desvio padrão
Controleadulto	34	28,80	405,50	113,55	114,75	85,10
SBS adulto	9	44,40	944,40	187,10	281,32	276,09
TG adulto	5	62,40	162,00	91,10	107,96	46,73

Controle x SBS:  $p=0,0098$

Controle x TG:  $p=0,7053$

f) CD61

TABELA 8 - ANÁLISE DA FLUORESCÊNCIA MÍNIMA-CD61 (ADULTOS)

CD61MÍN	n	Menor expressão	Maior expressão	Mediana	Média	Desvio padrão
Controleadulto	34	0,95	5,97	2,30	2,68	1,43
SBS adulto	9	0,10	5,66	2,30	2,58	1,81
TG adulto	5	0,00	3,07	0,10	0,69	1,33

Controle x SBS:  $p=0,8112$

Controle x TG:  $p=0,0081$

TABELA 9 - ANÁLISE DA FLUORESCÊNCIA MÁXIMA – CD61 (ADULTOS)

CD61MÁX	n	Menor expressão	Maior expressão	Mediana	Média	Desvio padrão
Controleadulto	34	21,20	201,00	61,85	65,76	32,38
SBS adulto	9	1,16	391,10	142,80	182,73	122,13
TG adulto	5	0,00	130,50	15,60	45,00	57,82

Controle x SBS:  $p=0,0007$

Controle x TG:  $p=0,2072$

TABELA 10 – ANÁLISE DA FLUORESCÊNCIA MÉDIA- CD61 (ADULTOS)

CD61MNX	n	Menor expressão	Maior expressão	Mediana	Média	Desvio padrão
Controleadulto	34	5,28	25,30	11,70	12,73	5,08
SBS adulto	9	9,70	27,30	19,70	20,01	6,03
TG adulto	5	0,00	15,50	1,25	5,22	6,95

Controle x SBS:  $p=0,0034$

Controle x TG:  $p=0,0321$

FIGURA 2 - INTENSIDADE DE FLUORESCÊNCIA MÍNIMA DE CD61-ADULTOS

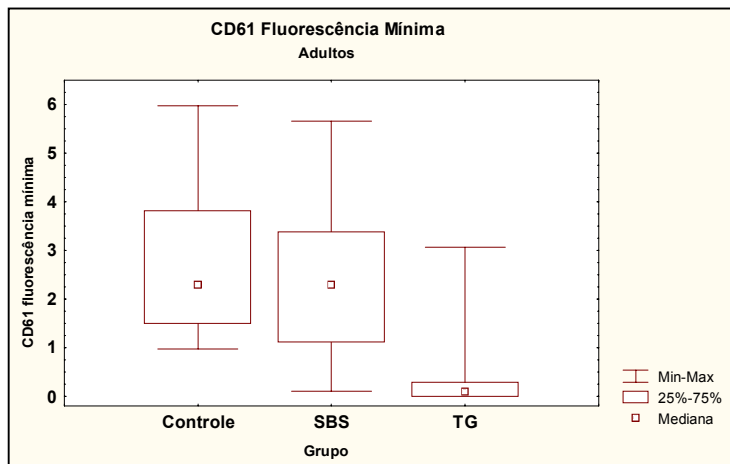
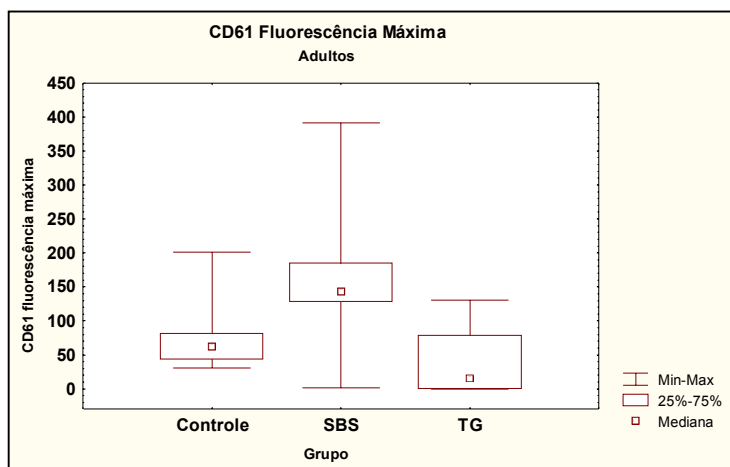


FIGURA 3 - INTENSIDADE DE FLUORESCÊNCIA MÁXIMA DE CD61-ADULTOS



Houve marcada diminuição na expressão do anticorpo monoclonal CD61 nos pacientes do grupo TG, em relação ao grupo controle, quando comparados quanto à média de intensidade de fluorescência e fluorescências mínima e máxima. Os pacientes do grupo SBS mostraram aumento significativo na expressão desta glicoproteína. A menor fluorescência deste marcador foi para os pacientes do grupo TG e a maior expressão para os pacientes SBS (Tabelas 7, 8, 9, 10 e Figuras 2 e 3).

g) CD41a



TABELA 11 - ANÁLISE DA FLUORESCÊNCIA MÍNIMA- CD41a (ADULTOS)

CD41aMÍN	n	Menor expressão	Maior expressão	Mediana	Média	Desvio padrão
Controle adulto	34	0,14	1,92	0,72	0,78	0,46
SBS adulto	9	0,23	10,20	1,18	2,47	3,13
TG adulto	5	0,00	0,97	0,00	0,33	0,46

Controle x SBS:  $p=0,0438$ Controle x TG:  $p=0,0482$ 

TABELA 12 - ANÁLISE DA FLUORESCÊNCIA MÁXIMA-CD41a (ADULTOS)

CD41aMÁX	n	Menor expressão	Maior expressão	Mediana	Média	Desvio padrão
Controleadulto	34	11,70	78,90	30,15	33,87	15,45
SBS adulto	9	19,40	602,30	125,90	159,89	178,18
TG adulto	5	0,00	24,90	0,00	9,46	12,98

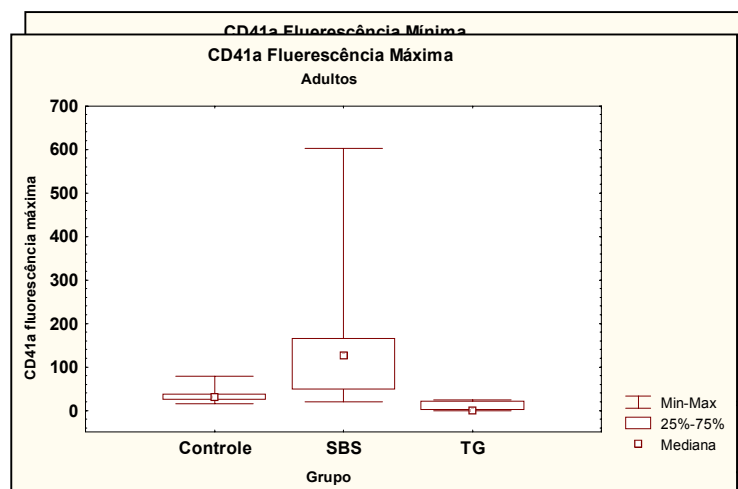
Controle x SBS:  $p=0,0019$ Controle x TG:  $p=0,0033$ 

TABELA 13 - ANÁLISE DA FLUORESCÊNCIA MÉDIA – CD41a MÉDIA (ADULTOS)

CD41aMNX	n	Menor expressão	Maior expressão	Mediana	Média	Desvio padrão
Controleadulto	34	2,32	11,20	5,81	5,65	2,09
SBS adulto	9	3,73	64,10	14,70	21,44	18,69
TG adulto	5	0,00	4,88	0,00	1,92	2,64

Controle x SBS:  $p=0,0013$ Controle x TG:  $p=0,0067$ 

FIGURA 4 - INTENSIDADE DE FLUORESCÊNCIA MÍNIMA DE CD4a-ADULTOS



#### FIGURA 5 - INTENSIDADE DE FLUORESCÊNCIA MÁXIMA DE CD4aA-ADULTOS

Houve marcada diminuição na expressão da fluorescência para AcMo CD41a na análise do grupo de pacientes TG. Houve um aumento significativo dos valores das fluorescências. Diferenças significativas foram encontradas quanto à análise das fluorescências mínima, máxima e média de intensidade de fluorescência para os pacientes SBS. A menor fluorescência deste marcador foi para os pacientes do grupo TG e a maior expressão, nos pacientes SBS (Tabelas 11, 12, 13 e Figuras 4 e 5).

#### h) TP

TABELA 14 - ANÁLISE DO TEMPO DE PROTROMBINA (ADULTOS)

TP	n	Menor valor	Maior valor	Mediana	Média	Desvio padrão
Controle adulto	34	13,00	13,00	13,00	13,00	0,00
SBS adulto	8	13,20	15,10	13,75	13,86	0,68
TG adulto	5	12,80	15,00	14,30	14,12	0,81

Controle x SBS:  $p < 0,0001$

Controle x TG:  $p = 0,0002$

#### i) TTPA

TABELA 15 - ANÁLISE DO T.DE TROMBOPLASTINA P. ATIVADA (ADULTOS)

TTPA	n	Menor valor	Maior valor	Mediana	Média	Desvio padrão
Controle adulto	34	34,00	34,00	34,00	34,00	0,00
SBS adulto	8	29,20	39,80	33,85	34,88	3,49
TG adulto	5	33,90	49,00	36,90	39,20	6,07

Controle x SBS:  $p = 0,1120$

Controle x TG:  $p = 0,0002$

Foram encontradas diferenças significativas quanto à análise do TP para ambos grupos em estudo e do TTPA quando comparados o grupo controle com grupo TG.

Não foram encontradas diferenças significativas quanto à análise do grau de fluorescência quanto aos anticorpos monoclonais CD42a quando comparados o grupo controle com os grupos de SBS adulto e TG.

No grupo dos pacientes adultos com diagnóstico/suspeita de Síndrome de Bernard-Soulier, foram observadas diferenças significativas quanto à diminuição da contagem de plaquetas, aumento do volume plaquetário médio e diminuição da expressão das fluorescências para os anticorpos monoclonais CD9 e CD42b, quando comparados com o grupo controle. Com relação aos marcadores CD36, CD41a e CD61, houve aumento significativo da expressão destas glicoproteínas nos pacientes SBS.

Nos pacientes com diagnóstico/suspeita de Trombastenia de Glanzmann, foram observadas diferenças significativas quanto diminuição da fluorescência para os AcMos CD61 e CD41a. Não foram encontradas diferenças significativas quanto à análise da contagem de plaquetas, VPM e grau de expressão dos marcadores CD9, CD42a e CD42b, quando comparado ao grupo controle.

## CRIANÇAS

### a) Contagem de Plaquetas

TABELA 16 - AVALIAÇÃO DO NÚMERO DE PLAQUETAS / $\mu$ L (CRIANÇAS)

Plaqueta	n	Menor valor	Maior valor	Mediana	Média	Desvio padrão
Controlecriança	15	180.000	379.000	277.000	278.200	52.277
SBS criança	6	6.000	136.000	20.500	44.667	51.270

Valor de p 0,0005

### b) Volume plaquetário médio

TABELA 17 - AVALIAÇÃO DO VOLUME PLAQUETÁRIO MÉDIO/FL (CRIANÇAS)

VPM	n	Menor valor	Maior valor	Mediana	Média	Desvio padrão
Controlecriança	15	6,50	9,10	7,60	7,61	0,73
SBS criança	6	6,50	24,60	11,85	13,65	6,94
<u>Valor de p 0,0238</u>						

As tabelas 16 e 17 mostram a diminuição na contagem de plaquetas e aumento do volume plaquetário médio no grupo de crianças com diagnóstico/suspeita de SBS, cujos valores são significativos em relação ao grupo controle. Não houve diferença estatisticamente significativa quanto aos pacientes TG.

#### c) CD9

TABELA 18 - ANÁLISE DA FLUORESCÊNCIA MÉDIA- CD9 (CRIANÇAS)

CD9MNX	n	Menor expressão	Maior expressão	Mediana	Média	Desvio padrão
Controlecriança	14	42,90	144,60	71,50	78,91	34,04
SBS criança	6	1,14	196,30	4,97	41,45	77,32
<u>Valor de p 0,0209</u>						

Foram encontradas diferenças significativas quanto à análise da fluorescência do marcador CD9, quanto à menor expressão, quando comparados o grupo controle com o grupo de pacientes SBS.

#### d) CD42a

TABELA 19 - ANÁLISE DA FLUORESCÊNCIA MÉDIA- CD42a (CRIANÇAS)

CD42aMNX	n	Menor expressão	Maior expressão	Mediana	Média	Desvio padrão
Controle riança	15	2,58	8,39	4,61	4,69	1,75
SBS criança	6	0,00	13,80	10,05	8,58	4,86
<u>Valor de p 0,0293</u>						

A tabela 19 mostra diferença significativa quanto ao grau de fluorescência com o AcMo CD42a, quando comparados o grupo controle com os pacientes com SBS.

#### e) CD42b

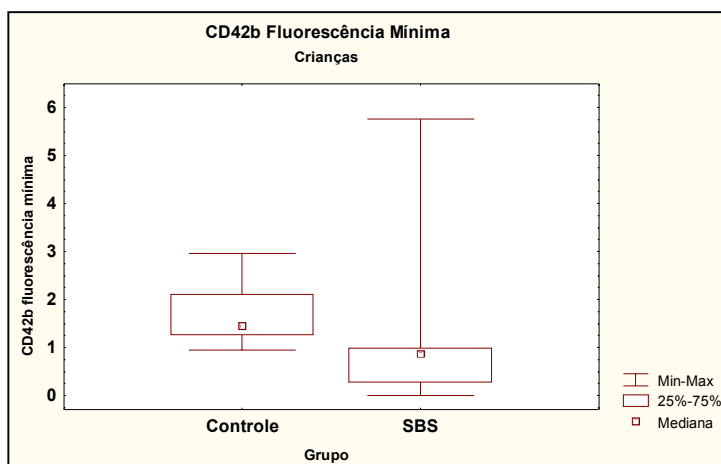
TABELA 20 - ANÁLISE DA FLUORESCÊNCIA MÍNIMA- CD42b (CRIANÇAS)

CD42bMín	n	Menor expressão	Maior expressão	Mediana	Média	Desvio padrão
Controlecriança	15	0,95	2,96	1,44	1,65	0,60
SBS criança	6	0,00	5,76	0,87	1,46	2,14

Valor de p 0,0237

Foi encontrada diferença significativa na análise da fluorescência mínima quanto ao anticorpo monoclonal CD42b, quando comparado o grupo de crianças SBS com o grupo controle (Tabela 20 e Figura 6).

FIGURA 6 - INTENSIDADE DE FLUORESCÊNCIA MÍNIMA DE CD42b-CRIANÇAS



#### f) CD61

TABELA 21 - ANÁLISE DA FLUORESCÊNCIA MÁXIMA- CD61 (CRIANÇAS)

CD61MÁX	n	Menor expressão	Maior expressão	Mediana	Média	Desvio padrão
Controlecriança	15	32,10	190,50	86,30	86,38	43,80
SBS criança	6	87,90	683,20	372,75	375,05	259,99

Valor de p 0,0064

TABELA 22 - ANÁLISE DA MÉDIA DA FLUORESCÊNCIA-CD61 MÉDIA (CRIANÇAS)

CD61MNX	n	Menor expressão	Maior expressão	Mediana	Média	Desvio padrão
Controlecriança	15	6,64	24,00	11,80	12,57	5,37
SBS criança	6	13,80	43,00	24,35	27,12	11,78

Valor de p 0,0051

As tabelas 21 e 22 mostram aumento significativo na expressão do marcador CD61 nos pacientes com SBS quando comparados ao controle (Fig. 7).

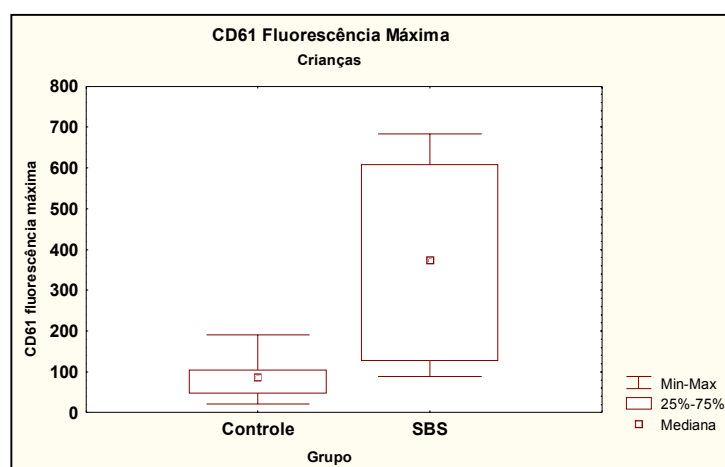


FIGURA 7 - INTENSIDADE DE FLUORESCÊNCIA MÁXIMA DE CD61-CRIANÇAS

#### g) CD41a

TABELA 23 - ANÁLISE DA FLUORESCÊNCIA MÍNIMA CD41a (CRIANÇAS)

CD41aMÍN	n	Menor expressão	Maior expressão	Mediana	Média	Desvio padrão
Controle criança	15	0,12	2,10	0,64	0,76	0,72
SBS criança	6	0,74	15,80	3,28	4,94	5,77

Valor de p 0,0127

TABELA 24 - ANÁLISE DA FLUORESCÊNCIA MÁXIMA-CD41a (CRIANÇAS)

CD41aMÁX	n	Menor expressão	Maior expressão	Mediana	Média	Desvio padrão
Controle criança	15	14,80	125,90	37,10	48,29	34,90
SBS criança	6	40,50	832,60	346,90	351,78	289,95

Valor de p 0,0064

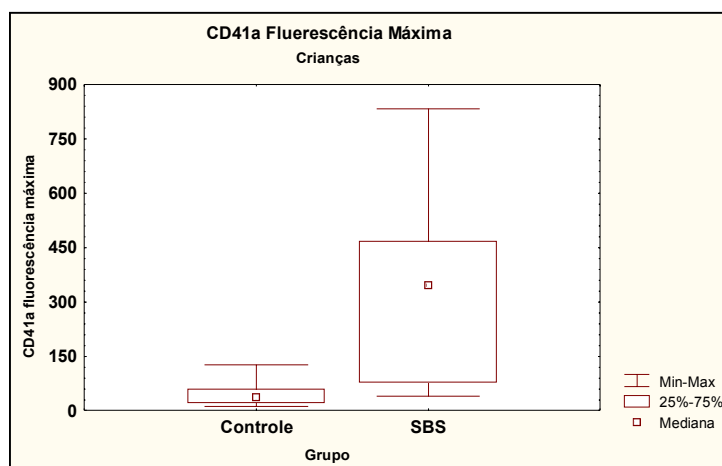
TABELA 25 - ANÁLISE DA MÉDIA DA FLUORESCÊNCIA- CD41a (CRIANÇAS)

CD41aMNX	n	Menor expressão	Maior expressão	Mediana	Média	Desvio padrão
Controlecriança	15	1,31	11,10	4,84	5,46	3,30
SBS criança	6	8,69	68,20	28,55	32,12	23,87

Valor de p 0,0021

As tabelas 23, 24 e 25 mostram aumento significativo quanto à expressão da fluorescência do AcMo CD41a nos pacientes estudados quando comparados ao controle (Fig. 8).

FIGURA 8 - INTENSIDADE DE FLUORESCÊNCIA MÁXIMA DE CD41a- CRIANÇAS



h) TP

TABELA 26 - AVALIAÇÃO DO TEMPO DE PROTROMBINA (CRIANÇAS)

TP	n	Menor valor	Maior valor	Mediana	Média	Desvio padrão
Controlecriança	15	13,00	13,00	13,00	13,00	0,00
SBS criança	5	12,80	15,00	14,30	14,12	0,81

Valor de p <0,0001

i) TTPA

TABELA 27- AVALIAÇÃO DO TEMPO DE TROMBOPLASTINA (CRIANÇAS)

TTPA	n	Menor valor	Maior valor	Mediana	Média	Desvio padrão
Controle criança	15	34,00	34,00	34,00	34,00	0,00
SBS criança	5	33,90	49,00	36,90	39,20	6,07

Valor de p 0,0230

Foram encontradas diferenças significativas quanto à análise do TP e TTPA quando comparados o grupo controle com os pacientes com SBS (Tabelas 26 e 27).

No grupo de pacientes crianças com diagnóstico/suspeita de Síndrome de Bernard-Soulier, houve diminuição da contagem de plaquetas, aumento do volume plaquetário médio e alterações no grau de expressão dos anticorpos monoclonais CD9, CD42a e CD42b. Quanto aos marcadores CD36, CD41a e CD61, houve aumento da expressão das fluorescências, quando comparados com o normal.

### 3.3 VARIÁVEIS NOMINAIS DICOTÔMICAS

TABELA 28 - TS

Variável	Classificação	Controle adulto	SBS adulto	TG adulto
TS	Normal	34 100,0%	3 33,3%	2 50,0%
	Anormal (aumentado)	0 0,0%	6 66,7%	2 50,0%
Total		34	9	4

Grupos sob comparação	Valor de p
Controle adulto x SBS adulto	<0,0001
Controle adulto x TG adulto	0,0016

No grupo de pacientes com SBS houve 33,3% (3 pacientes) com TS normal e 66,7% (6 pacientes) com TS anormal (aumentado). No grupo de pacientes com TG houve 50% (2 pacientes) com TS normal e 50% (2 pacientes) com TS anormal (aumentado). Não houve diferença entre os normais.



## A) ANÁLISE DAS FLUORESCÊNCIAS NO GRUPO CONTROLE E PACIENTES ADULTOS

TABELA 29 - CD9

Variável	Classificação	Controle adulto	SBS adulto	TG adulto
CD9	Normal	34 100,0%	6 75,0%	5 100,0%
	Anormal diminuído	0 0,0%	2 25,0%	0 0,0%
Total		34	8	5

Grupos sob comparação	Valor de p
Controle adulto x SBS adulto	0,0325
Controle adulto x TG adulto	1,0000

No grupo de pacientes com SBS houve 75,0% (6 pacientes) com CD9 normal e 25,0% (2 pacientes) com CD9 anormal (diminuído). Não houve diferença entre os normais e o grupo de pacientes TG.

TABELA 30 - CD42a

Variável	Classificação	Controle adulto	SBS adulto	TG adulto
CD42a	Normal	34 100,0%	6 66,7%	5 100,0%
	Anormal (diminuído)	0 0,0%	3 33,3%	0 0,0%
Total		34	9	5

Grupos sob comparação	Valor de p
Controle adulto x SBS adulto	0,0068
Controle adulto x TG adulto	1,0000

No grupo de pacientes com SBS houve 66,7% (6 pacientes) com CD42a normal e 33,3% (3 pacientes) com CD42a anormal (diminuído). Não houve diferença entre os normais e o grupo de pacientes TG.

TABELA 31 - CD42b

Variável	Classificação	Controle adulto	SBS adulto	TG adulto
CD42b	Normal	34 100,0%	5 55,6%	5 100,0%
	Anormal (diminuído)	0 0,0%	4 44,4%	0 0,0%
Total		34	9	5

Grupos sob comparação	Valor de p
Controle adulto x SBS adulto	0,0010
Controle adulto x TG adulto	1,0000

No grupo de pacientes com SBS houve 55,6% (5 pacientes) com CD42b normal e 44,4% (4 pacientes) com CD42b anormal (diminuído). Não houve diferença entre os normais e o grupo de pacientes TG.

TABELA 32 - CD61

Variável	Classificação	Controle adulto	SBS adulto	TG adulto
CD61	Normal	34 100,0%	8 88,9%	1 20,0%
	Anormal	0 0,0%	1 11,1%	4 80,0%
Total		34	9	5

Grupos sob comparação	Valor de p
Controle adulto x SBS adulto	0,2093
Controle adulto x TG adulto	0,0001

No grupo de pacientes com SBS houve 88,9% (8 pacientes) com CD61 normal e 11,1% (1 paciente) com CD61 anormal (aumentado). No grupo de pacientes com TG houve 20,0% (1 paciente) com CD61 normal e 80,0% (4 pacientes) com CD61 anormal (diminuído). Não houve diferença entre os normais.

TABELA 33 - CD41a

Variável	Classificação	Controle adulto	SBS adulto	TG adulto
CD41a	Normal	34 100,0%	9 100,0%	2 40,0%
	Anormal	0 0,0%	0 0,0%	3 60,0%
Total		34	9	5

Grupos sob comparação	Valor de p
Controle adulto x SBS adulto	1,0000
Controle adulto x TG adulto	0,0011

No grupo de pacientes com SBS houve 100,0% (9 pacientes) com CD41a normal. No grupo de pacientes TG, 40,0% (2 pacientes) foram normais e 60,0% (3 pacientes) apresentaram CD61 anormal (diminuído).

Os pacientes adultos SBS apresentaram aumento no Tempo de Sangramento e alterações fenotípicas com os anticorpos monoclonais CD9, CD42a, CD42b que foram diminuídos.

Os pacientes adultos TG apresentaram aumento no Tempo de Sangramento e alterações fenotípicas com os anticorpos monoclonais CD61 e CD41a diminuídos.

## B) ANÁLISE DAS PERCENTAGENS NO GRUPO CONTROLE E PACIENTES ADULTOS

TABELA 34 - CD42a %

Variável	Classificação	Controle adulto	SBS adulto
% CD42a	Normal	34 100,0%	7 77,8%
	Anormal	0 0,0%	2 22,2%
Total		34	9

Grupos sob comparação	Valor de p
Controle adulto x SBS adulto	0,0399

No grupo de pacientes com SBS houve 77,8% (7 pacientes) com CD42a normal e 22,2% (2 pacientes) com CD42a anormal. Não houve diferença entre os normais.

TABELA 35 - CD42b %

Variável	Classificação	Controle	SBS adulto
----------	---------------	----------	------------

		adulto	
% CD42b	Normal	34 100,0%	7 77,8%
	Anormal	0 0,0%	2 22,2%
Total		34	9

Grupos sob comparação	Valor de p
Controle adulto x SBS adulto	0,0399

No grupo de pacientes com SBS houve 77,8% (7 pacientes) com CD42b normal e 22,2% (2 pacientes) com CD42a anormal. Não houve diferença entre os normais.

TABELA 36 - CD61%

Variável	Classificação	Controle adulto	TG adulto
% CD61	Normal	34 100,0%	1 20,0%
	Anormal	0 0,0%	4 80,0%
Total		34	5

Grupos sob comparação	Valor de p
Controle adulto x TG adulto	0,0001

No grupo de pacientes com TG houve 20,0% (1 paciente) com CD61 normal e 80,0% (4 pacientes) com CD61 anormal. Não houve diferença entre os normais.

TABELA 37 - CD41a %

Variável	Classificação	Controle adulto	TG adulto
% CD41a	Normal	34 100,0%	2 40,0%
	Anormal	0 0,0%	3 60,0%
Total		34	5

Grupos sob comparação	Valor de p
Controle adulto x TG adulto	0,0011

No grupo de pacientes com TG houve 40,0% (2 pacientes) com CD41a normal e 60,0% (3 pacientes) com CD61 anormal. Não houve diferença entre os normais.

### C) ANÁLISE DOS EXAMES COFATOR DA RISTOCETINA, FATOR VIII E FATOR DE VON WILLEBRAND NO GRUPO SBS ADULTO

TABELA 38 - FATOR VIII

Variável	Classificação	Controle adulto	SBS adulto
Fator VIII	Normal	34 100,0%	3 33,3%
	Anormal (aumentado)	0 0,0%	6 66,7%
Total		34	9

Grupos sob comparação	Valor de p
Controle adulto x SBS adulto	0,0001

No grupo de pacientes com SBS houve 66,7% (6 pacientes) com Fator VIII normal e 33,3% (3 pacientes) com Fator VIII anormal (aumentado). Não houve diferença entre os normais.

TABELA 39 - FATOR DE VON WILLEBRAND

Variável	Classificação	Controle adulto	SBS adulto
Fator de Willebrand	Normal	34 100,0%	9 100,0%
	Anormal	0 0,0%	0 0,0%
Total		34	9

Grupos sob comparação	Valor de p
Controle adulto x SBS adulto	1,0000

TABELA 40 - COFATOR DA RISTOCETINA

Variável	Classificação	Controle adulto	SBS adulto
Cofator de ristocetina	Normal	34 100,0%	4 44,4%
	Anormal (aumentado)	0 0,0%	5 55,6%
Total		34	9

Grupos sob comparação	Valor de p
Controle adulto x SBS adulto	0,0001

No grupo de pacientes com SBS houve 44,4% (4 pacientes) com Cofator da Ristocetina normal e 55,6% (5 pacientes) com Cofator da Ristocetina anormal (aumentado). Não houve diferença entre os normais.

Os pacientes adultos SBS apresentaram alterações nos percentuais de plaquetas positivas para os anticorpos monoclonais CD42a, CD42b; que foram diminuídos. Este grupo apresentou os exames Cofator da Ristocetina e fator VIII aumentados.

Os pacientes adultos TG apresentaram alterações nos percentuais com os anticorpos monoclonais CD61 e CD41a; que foram diminuídos.

#### D) ANÁLISE DAS FLUORESCÊNCIAS NOS CONTROLES E PACIENTES CRIANÇAS

TABELA 41 - TS (CRIANÇAS)

Variável	Classificação	Controle criança	SBS criança
TS	Normal	15 100,0%	3 50,0%
	Anormal (aumentado)	0 0,0%	3 50,0%
Total		15	6

Valor de p: 0,0150

No grupo de pacientes com SBS houve 50,0% (3 pacientes) com TS normal e 50,0% (3 pacientes) com TS anormal (aumentado). Não houve diferença entre os normais.

TABELA 42 - CD9 (CRIANÇAS)

Variável	Classificação	Controle criança	SBS criança
CD9	Normal	15 100,0%	2 33,3%
	Anormal	0 0,0%	4 66,7%
Total		15	6

Valor de p: 0,0025

No grupo de pacientes com SBS houve 33,3% (2 pacientes) com CD9 normal e 66,7% (4 pacientes) com CD9 anormal (diminuído). Não houve diferença entre os normais.

TABELA 43 - CD42a (CRIANÇA)

Variável	Classificação	Controle criança	SBS criança
CD42a	Normal	15 100,0%	5 83,3%
	Anormal	0 0,0%	1 16,7%
Total		15	6

Valor de p: 0,2857

TABELA 44 - CD42b (CRIANÇA)

Variável	Classificação	Controle criança	SBS criança
CD42b	Normal	15 100,0%	3 50,0%
	Anormal	0 0,0%	3 50,0%
Total		15	6

Valor de p: 0,0150

No grupo de pacientes com SBS houve 50,0% (3 pacientes) com CD42b normal e 50,0% (3 pacientes) com CD42b anormal (diminuído). Não houve diferença entre os normais.

A análise estatística dicotômica nominal mostrou aumento no tempo de sangramento e alterações nos pacientes com SBS quanto aos marcadores CD9 e CD42b. O grupo controle foi 100% normal.

#### E) ANÁLISE DAS PERCENTAGENS NO GRUPO CONTROLE E PACIENTES CRIANÇAS

TABELA 45 - CD42a % EM CRIANÇAS

Variável	Classificação	Controle criança	SBS criança
% CD42a	Normal	15 100,0%	3 50,0%
	Anormal	0 0,0%	3 50,0%
Total		15	6

Valor de p: 0,0150

No grupo de pacientes com SBS 50,0% (3 pacientes) com CD42a normal e 50,0 % (3 pacientes) com CD42a anormal (diminuído em %). Não houve diferença entre os normais.

TABELA 46 - CD42b % EM CRIANÇAS

Variável	Classificação	Controle criança	SBS criança
% CD42b	Normal	15 100,0%	4 67,7%
	Anormal	0 0,0%	2 33,3%
Total		15	6

Valor de p: 0,0714



No grupo de pacientes com SBS houve 50,0% (3 pacientes) com CD42b normal e 50,0% (3 pacientes) com CD42b anormal (diminuído em %). Não houve diferença entre os normais.

#### F) ANÁLISE DOS EXAMES COFATOR DA RISTOCETINA, FATOR VIII E FATOR DE VON WILLEBRAND NO GRUPO SBS CRIANÇA

TABELA 47 - FATOR VIII (CRIANÇAS)

Variável	Classificação	Controle criança	SBS criança
Fator VIII	Normal	15 100,0%	0 0, 0%
	Anormal	0 0,0%	5 100,0%
Total		15	5

Valor de p: 0,0001

TABELA 48 - FATOR DE VON WILLWBRAND (CRIANÇAS)

Variável	Classificação	Controle criança	SBS criança
Fator v de Willebrand	Normal	15 100,0%	5 100,0%
	Anormal	0 0,0%	0 0,0%
Total		15	5

Valor de p:1,0000

TABELA 49 - AVALIAÇÃO DO COFATOR DA RISTOCETINA

Variável	Classificação	Controle criança	SBS criança
Cofator da ristocetina	Normal	15 100,0%	2 40,0%
	Anormal	0 0,0%	3 60,0%
Total		15	5

Valor de p:0,0083

No grupo de pacientes com SBS houve 40,0% (2 pacientes) com Cofator da Ristocetina normal e 60,0% (3 pacientes) com Cofator da Ristocetina anormal (aumentado). As crianças foram normais para o FvW.

De uma maneira geral, a análise estatística dicotômica nominal mostrou aumento no cofator da ristocetina e fatorVIII. O fator de von Willebrand foi normal para grupo de pacientes adultos e crianças. Nos pacientes com SBS, os marcadores CD9, CD42a e CD42b, se mostraram diminuídos. O grupo controle foi 100% normal (Figuras 9 e 10).

A expressão e as quantidades das glicoproteínas CD42a e CD42b foram normais em 5 pacientes adultos e 1 criança. Notou-se um leve aumento das fluorescências quanto ao CD61 e CD41a, resultado este semelhante aos demais pacientes.

FIGURA 9 - GRUPO SBS-ADULTOS X CONTROLE

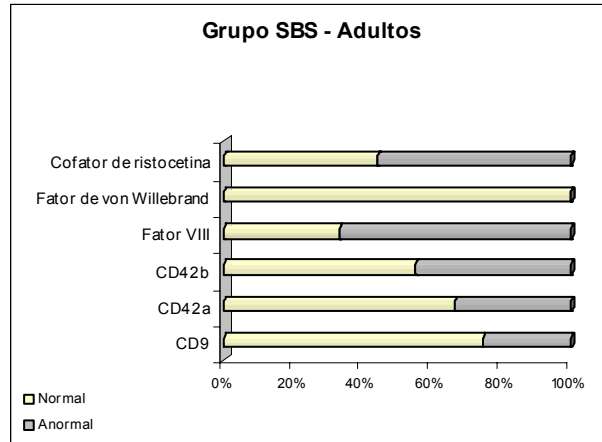
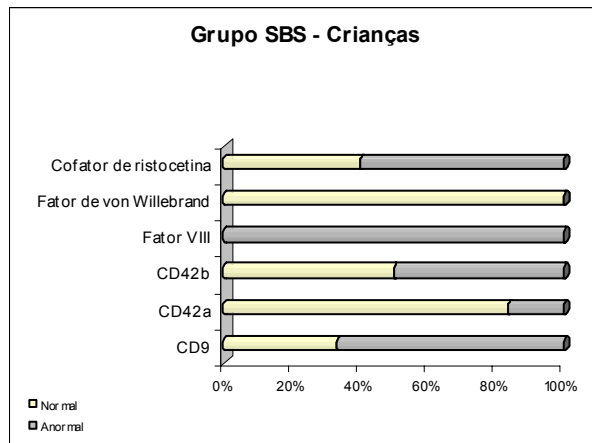


FIGURA. 10 GRUPO BSS CRIANÇA X CONTROLE



## DISCUSSÃO

A Síndrome de Bernard-Soulier e a Trombastenia de Glanzmann são consideradas doenças raras; estudos internacionais mostram uma prevalência estimada de 1 caso em 1.000.000 para os pacientes homozigotos, mas a prevalência para os pacientes heterozigotos é de 1 caso em 500. Entretanto, a proporção de heterozigotos com plaquetas baixas, tendência a sangramento ou ambas, é desconhecida, pois muitas vezes podem ser erroneamente diagnosticadas. Não encontramos estudos destas enfermidades na literatura brasileira.

O propósito deste trabalho foi avaliar o grau de expressão das glicoproteínas GPIb $\alpha$ /GPIX na Síndrome de Bernard-Soulier e GPIIb/GPIIIa na Trombastenia de Glanzmann, por citometria de fluxo, utilizando anticorpos monoclonais específicos, que caracterizam os antígenos plaquetários e cujos resultados foram significativos nos diferentes grupos analisados. Esta finalidade foi direcionada para o auxílio diagnóstico destas doenças em nosso hospital, onde exames como agregação plaquetária, pesquisa do fator de von Willebrand e cofator da ristocetina não são realizados.

As doenças estudadas são de origem hereditária autossômica recessiva, portanto o sexo não foi considerado fator relevante para fins comparativos.

A incidência destas doenças é maior nas populações em que ocorre casamento consangüíneo, em países como a Turquia, Iraque, Índia e outros. Neste estudo tivemos somente um caso relatado de casamento consangüíneo, no grupo SBS, cujos pais são primos em primeiro grau (paciente 1-FP).

No grupo controle e de pacientes, não houve diferença estatisticamente significativa entre os adultos e crianças quanto aos resultados por citometria de fluxo, indicando que a idade não é variável importante. Os artigos revisados não mencionam esta preocupação em parear pela idade.

### 4.1 SÍNDROME DE BERNARD-SOULIER

No grupo de crianças formado por 6 pacientes com SBS, 5 (83,3%) mostraram alterações com os anticorpos monoclonais CD42a e CD42b e 1 paciente (16,7%) apresentou percentual e expressão normais destes marcadores. Nos 5 pacientes com anormalidades, houve um deles com ausência total de expressão de CD42a e CD42b, ausência esta que define o diagnóstico clássico da doença por citometria de fluxo (KENNY et al., 1999; HILMANN et al., 2002).

Com o advento desta técnica, observou-se uma grande heterogeneidade tanto no percentual quanto na expressão destes marcadores. No início da década de 1990, HOURDILLE et al. estudaram um paciente com ausência de CD42b e diminuição da expressão do CD42a e demonstraram que a avaliação da intensidade de fluorescência é tão importante quanto o percentual para o diagnóstico fenotípico.

Em nosso estudo, houve 1 paciente com diminuição do percentual e intensidade de fluorescência normal de CD42a e CD42b, como encontrado por WARE et al. (1990). Em outro paciente foi observada expressão e percentual normal para o CD42b e diminuição da expressão de CD42a com percentual normal, achado este igual ao descrito por NODA et al. (1995). Dois outros pacientes apresentaram diminuição do grau de fluorescência do marcador CD42b, com percentual normal, como nos estudos realizados por LI et al. (1995), que analisaram pacientes com ausência, diminuição ou expressão normal deste anticorpo.

Nos pacientes com Síndrome de Bernard-Soulier, apenas uma criança mostrou trombocitopenia, história pregressa de sangramento e plaquetas com morfologia e VPM normais (paciente 9 - SO). A análise por citometria de fluxo apresentou diminuição do percentual de CD42a em 75%, cujos valores no grupo controle foram de 90,5-99,1% e grau de fluorescência normal; o CD42b apresentou percentual e fluorescência normais. Esta paciente tem o pai com a mesma clínica e parâmetros de citometria de fluxo normais. Refere um irmão falecido devido à leucemia mieloide aguda. Trabalho realizado por BALDUINI (2002) mostra por meio de técnicas moleculares e estudo familiar que, trombocitopenias hereditárias, inclusive as com tamanho normal de plaquetas, derivam de um defeito no mecanismo regulatório da

megacariocitopoiese, resultando em defeitos no citoesqueleto e propensão a desenvolver leucemia aguda.

No grupo de adultos formado por 9 pacientes, 4 (44,4%) mostraram alterações com os marcadores CD42a e CD42b e 5 pacientes (55,6%) apresentaram percentual e fluorescência normais. Dos 4 pacientes anormais pela citometria de fluxo, 2 apresentaram ausência total de CD42a e CD42b, como observado em vários estudos (TOMER et al., 1994; DERMOT et al. 1999; MORAN et al., 2000; GONZALEZ-MANCHON et al., 2003). Nos adultos, também foi observada a variabilidade na expressão antigênica dos anticorpos monoclonais em um dos pacientes, que mostrou diminuição da expressão da fluorescência de CD42a e CD42b e percentuais normais, como encontrado em outros trabalhos (KUNISHIMA et al., 1997; AFSHAR-KHARGHAN et al., 2000; SAVOIA et al., 2001). O último paciente mostrou diminuição do grau de fluorescência do CD42b e percentual normal, além de fluorescência e percentual normais para o CD42a, como mostram outros autores LI et al. (1996) e AFSHAR-KHARGHAN; LOPEZ (1997).

Em nosso estudo, foram realizados, além da citometria de fluxo, os testes de coagulação e agregação plaquetária, como também exames de cofator da ristocetina, pesquisa do fator de von Willebrand e fator VIII, porque encontramos casos considerados clinicamente como SBS, porém com fenótipo normal.

Nos trabalhos revisados, além dos testes de coagulação, função plaquetária e citometria de fluxo, há uma seqüência de exames para os pacientes com alterações plaquetárias quali ou quantitativas, como *imunnoblotting e reação da polimerase em cadeia (PCR)*, para comprovação diagnóstica destas doenças hereditárias. Estes estudos mostram que a diversidade dos achados é devida às inúmeras mutações que se apresentam na SBS.

O cofator da ristocetina, fator VIII e fator de von Willebrand, foram realizados no laboratório de hemostasia da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp), que se prontificou a executar os exames para todos os pacientes SBS tanto com citometria

normal como anormal, bem como a extração do DNA das amostras enviadas, para complementação futura.

Dos 15 pacientes estudados, 6 (40,0%) apresentaram análise normal por citometria de fluxo, sem alteração no grau de fluorescência ou no percentual de positividade para os anticorpos monoclonais utilizados, quando comparados ao controle normal.

SAVOIA et al. (2001) também se defrontaram com pacientes que apresentavam citometria de fluxo normal. A expressão do complexo GPIb $\alpha$ /GPIb $\beta$ /GPIX/GPV, nestes casos, tinha um perfil de fluorescência chamado não SBS. Estes autores descreveram 22 pacientes, provenientes de 12 famílias de origem italiana, não relacionadas, sendo que 16 pacientes tinham perfil fenotípico de SBS e 2 pacientes apresentavam fenótipo normal e clínica de sangramento, plaquetas gigantes e VPM aumentados, não sendo pertencentes às famílias com fenótipo SBS. Os autores identificaram estes 2 pacientes como portadores de Macrotrombocitopenia Autossômica Dominante e não Síndrome de Bernard-Soulier.

Apesar de a análise morfológica realizada em todos os pacientes não apresentar inclusões leucocitárias, a morfologia não exclui a possibilidade de doença autossômica dominante/macro-trombocitopênica, como Anomalia de May-Hegglin e Síndrome de Sebastian, nos pacientes que mostraram citometria de fluxo com expressão normal das glicoproteínas ou, até mesmo, diminuição das mesmas (heterozigotos), como mostrado por JANTUNEN et al. (1994) e DI PUMPO et al. (2002). Estes autores sugerem a biologia molecular para exclusão destas duas doenças.

Os defeitos genéticos da Anomalia de May-Hegglin e Síndrome de Sebastian foram mapeados recentemente (Martignetti, JA, 2000). A localização do defeito está no braço longo do cromossoma 22, identificado no gene MYH9, na cadeia pesada da proteína miosina II não muscular. Ambas só podem ser diferenciadas por microscopia eletrônica.

Além destas doenças, este gene está envolvido com outras entidades que cursam com macroplaquetas e sangramento, como a Síndrome de Fechtner e Síndrome de Epstein, que, por sua vez, podem ser diferenciadas clinicamente.

Outra doença relacionada com hereditariedade, trombocitopenia e história de sangramento, é a doença de von Willebrand. O subtipo 2B é caracterizado por um defeito qualitativo no fator de von Willebrand, a transmissão é autossômica dominante e os multímeros do fvW são sintetizados, mas mostram ligações, espontâneas e freqüentes ao GPIb $\alpha$  das plaquetas. Como consequência, há deficiência no plasma, mas não nas plaquetas, que em alguns casos mostram-se gigantes (NURDEN et al. 2000). MILLER et al., (1991) estudaram a Plaqueta - Tipo von Willebrand (Pseudo-von Willebrand), com características similares ao Tipo 2B de von Willebrand. Neste, o defeito está no multímero do fator de von Willebrand e no pseudo- von Willebrand, o defeito está no receptor GPIb $\alpha$  da plaqueta. Em ambos, o defeito é qualitativo. Neste estudo, não foram encontrados pacientes com estes achados, pois todos apresentaram a pesquisa do fator de von Willebrand normal.

A Púrpura Trombocitopênica Idiopática Crônica (PTI) é uma entidade que também pode ocasionar plaquetas de diâmetro aumentado. Alguns dos pacientes deste estudo com suspeita de PTI e sem histórico de sangramento familiar foram primeiramente tratados com corticóide, sem melhora do quadro clínico. Esta dificuldade diagnóstica foi comentada por outros autores, que descreveram casos em que os pacientes foram esplenectomizados, sem melhora clínica e cujo diagnóstico era SBS (TOMER et al., 1994; LI et al., 1996; LOPEZ et al., 1998; DERMOT et al., 1998).

Ao mesmo tempo em que há dificuldade em afirmar que estes pacientes com parâmetros normais de citometria de fluxo normal sejam SBS, há também dificuldade em excluí-los, já que não foram avaliados os anticorpos monoclonais CD42c (GPIb $\beta$ ) e CD42d (GPV), porque não estavam disponíveis para comercialização até o final de 2001, quando foi idealizado o projeto desta pesquisa. A ordem de prioridade GPIb $\alpha$ >GPIX>GPIb $\beta$ >GPV, está baseada na freqüência dos genes afetados nas



glicoproteínas plaquetárias, nos estudos relatados de SBS, segundo LOPEZ em 1998. Outro motivo é que a SBS comumente é uma doença autossômica recessiva, mas em raros casos, pode ser dominante. A doença é então causada pela expressão de uma molécula defeituosa, na qual a citometria de fluxo é normal e cujo diagnóstico é realizado pelo estudo familiar das glicoproteínas plaquetárias e da biologia molecular (BALDUINI; LOLASCON; SAVOIA, 2002).

Quanto aos outros anticorpos monoclonais utilizados nesta pesquisa, CD41a e CD61, dos 15 pacientes, 4 foram normais e 11 mostraram aumento da expressão antigênica: 6 pacientes (40,0%) mostraram aumento apenas de CD41a; 2 pacientes (13,3%) apenas do CD61; 3 pacientes (20,0%) apresentaram aumento de CD41a e CD61 e 4 pacientes (26,7%) tinham expressão normal. O aumento do grau de fluorescência destas glicoproteínas, encontrado neste trabalho, foi também motivo de análise por outros autores, que relacionaram esta elevação ao diâmetro aumentado/gigante das plaquetas. Inferem também que o encontro destas glicoproteínas aumentadas, na ausência de alteração das GPIIb/GPIX, pode direcionar a pesquisa mais aprofundada para o diagnóstico de SBS (KUNISHIMA, 1997; DERMOT, 1999; AFSHAR-KHARGHAN, 2000). A expressão normal de CD41a e CD61, em pacientes SBS, foi também encontrada por KUNISHIMA et al. (1994).

O anticorpo monoclonal CD36 mostrou resultado significativo quanto ao grau de fluorescência máxima no grupo de adultos com SBS, achado este também encontrado por LOZANO et al. (1995). No grupo de crianças, o resultado não foi estatisticamente significativo.

O anticorpo monoclonal CD9 mostrou-se diminuído significativamente, tanto no grupo formado por crianças quanto no grupo de adultos, quando comparados aos grupos controles. Estudos com este anticorpo monoclonal sugerem o envolvimento desta glicoproteína na sinalização, adesão e na agregação plaquetárias (WORTHINGTON; CARROL; BOUCHEIX, 1990; CLAY, 2001; WEI-MIN, 2001), porém não foram encontrados estudos relacionando SBS com o CD9.

## 4.2 TROMBASTENIA DE GLANZMANN

Em 1972, CAEN classificou a Trombastenia de Glazmann em tipos I, II e variante, por meio da dosagem de fibrinogênio e tempo de retração do coágulo. Em 1990, GEORGE, CAEN, NURDEN incluíram na classificação, os marcadores CD41a e CD61.

O tipo I, que representa a maioria dos casos, está caracterizado por deficiência severa de GPIIb e/ou GPIIIa (CD41 e/ou CD61), menos que 5% do normal da fluorescência. O tipo II apresenta deficiência moderada de CD41/CD61, de 10-20% do normal da fluorescência. Há aproximadamente 8% de casos, chamados de variantes, em que o defeito parece ser funcional e não molecular. As plaquetas destes indivíduos apresentam 50-100% da quantidade normal de GPIIb/GPIIIa, mas demonstram ausência ou mínima agregação plaquetária. Enquanto os tipos I e II mostram alterações quantitativas, a variante conduz a um defeito qualitativo. A severidade dos sintomas independe da classificação dos tipos de TG, isto é, das quantidades de glicoproteínas expressas nas plaquetas dos pacientes.

Neste estudo, houve correlação dos resultados de citometria de fluxo e agregação plaquetária, que mostrou alterações para os agonistas ADP e/ou epinefrina e normalidade para a ristocetina. No paciente que apresentou citometria de fluxo normal, o estudo de agregação plaquetária foi anormal, com ausência de 2<sup>a</sup> onda para os agonistas ADP e epinefrina, o que confere o diagnóstico de Trombastenia de Glanzmann tipo variante, como descrito na literatura (JENNINGS et al. 1986; GONZALEZ-MANCHON et al. 1999; TAO et al. 2000).

No grupo de 5 pacientes com diagnóstico de Trombastenia de Glanzmann, comprovados pela agregação plaquetária, 4 (80%) mostraram alterações com os anticorpos monoclonais CD41a e CD61, que os classifica como TG tipo I. Estes achados também foram encontrados por GEORGE, CAEN, NURDEN (1990), quando

estudaram 51 pacientes, sendo 37 pacientes do tipo I, 9 do tipo II e 5 pacientes com TG variante. Em nosso estudo, não encontramos pacientes do tipo II.

Dos 4 pacientes com anormalidades, um deles apresentou ausência total de CD41a e CD61 e outro mostrou ausência de CD41a, com diminuição acentuada do CD61. Estes fenótipos também foram encontrados por outros autores (JENNINGS et al. 1986, COLLIER et al. 1986, CAEN 1990, MARKOVITCH et al. 1998 e TAO et al. 2000). Um paciente apresentou ausência de CD41a e expressão normal de CD61, como também demonstrado por PERETZ et al. (1995) e 1 paciente mostrou fluorescência normal para CD41a e ausência de CD61, também estudado por BRAY; SHUMAN (1990) e MOREL-KOPP et al. (1997).

Apesar da amostra pequena, a citometria mostrou ser de grande valia no diagnóstico desta doença, já que 4 de 5 pacientes apresentaram correlação entre os dois métodos diagnósticos.

Embora todas as doenças que envolvam história de sangramento e hereditariedade sejam raras, este estudo analisou 15 pacientes com suspeita/diagnóstico de SBS e 5 com diagnóstico de TG. Das amostras estudadas, 14 (70%) apresentaram algum tipo de alteração nos marcadores específicos plaquetários pela análise imunofenotípica.

A citometria de fluxo mostrou ser um método simples e rápido de avaliação tanto do percentual de positividade como dos graus de fluorescência dos marcadores CD42a e CD42b na Síndrome de Bernard-Soulier e CD41a e CD61 na Trombastenia de Glanzmann, constituindo ferramenta indispensável no auxílio diagnóstico das doenças hemorrágicas hereditárias.

## **5 CONCLUSÕES**

### **SÍNDROME DE BERNARD-SOULIER**

- 1- Houve ausência das glicoproteínas GPIb/GPIX em 3 dos 15 pacientes (20,0%).
- 2- Houve diminuição do grau de expressão das glicoproteínas GPIb/IX em 4 dos 15 pacientes (26,7%).
- 3- Houve diminuição do percentual das glicoproteínas GPIb/IX em 2 dos 15 pacientes (13,3%).
- 4- Houve expressão normal em 6 pacientes (40,0%).
- 5- Houve aumento na expressão de GPIIb/IIIa em 70,0% dos pacientes.

### **TROMBASTENIA DE GLANZMANN**

- 1- Houve ausência de GPIIb/IIIa em 1 paciente (20,0%).
- 2- Houve diminuição do grau de expressão das glicoproteínas GP IIb/IIIa em 3 dos 5  
pacientes (60,%).
- 3- Houve expressão normal em 1 paciente (20,0%).

## **GERAIS**

Este estudo concluiu que a citometria de fluxo é uma ferramenta a mais no auxílio diagnóstico na Síndrome de Bernard-Soulier e na Trombastenia de Glanzmann, uma vez que o exame de agregação plaquetária não é realizado neste hospital, bem como no HIPP e no hospital Evangélico, entre outros hospitais públicos deste estado. Outro fator importante é que o agregômetro é sensível em amostras com contagem de plaquetas superior a  $90.000/\text{mm}^3$ .

## REFERÊNCIAS

- AFSHAR-KHARGHAN, V; LOPEZ, J.A. Bernard-Soulier Syndrome caused by a dinucleotide deletion and reading frameshift in the region encoding the glycoprotein Ib $\alpha$  transmembrane domain. **Blood**, Washington, v.90, n.7, p. 2634-2643,1997.
- AFSHAR-KHARGHAN, V.; CEAIG, F.C.; LOPEZ, J.A. Bernard-Soulier syndrome in a patient doubly heterozygous for two frameshift mutations in the glycoprotein Ib $\alpha$  gene. **British Journal of Haematology**, Oxford, v.110, n. 4, p. 919-924, 2000.
- BAKER, E.K. et al. A genetic analysis of integrin function: Glanzmann thrombasthenia in vitro. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.94, n. 5, p.1973-1978, 1997.
- BALDUINI, C.L.; LOLASCON, A.; SAVOIA, A. inhrited thrombocytopenias: from genes to therapy. **Haematologica**, Pavia, v. 87, n. 8, p. 860-880, 2002.
- BARCLAY, A. N. et al. The Leucocyte antigens. In: \_\_\_\_\_. **The leucocyte antigen-facts book**. San Diego: Academic Press Harcourt Brace, 1997. p.132-613.
- BEN-EZRA, J. Megakaryocyte synthesis is the source of epidermal growth factor in human platelets. **American Journal of Pathology**, Bethesda, v.137, p. 755-759, 1990.
- BERDITCHEVSKI, F; ODINTSOVA, E. Characterization of integrin–tetraspanin adhesion complexes: role of tetraspanins in integrin signaling. **The Journal of Cell Biology**, New York, v. 146, n. 2, p.477-492, 1999.
- BERNARD, J.; SOULIER J. P: Sur une nouvelle varieté de dystrophie thrombocytaire hémorragipare congénitale. **Semaine des Hôpitaux de Paris**, v. 24, p. 3217-3223, 1948.
- BODE, A.P.; HICKERSON, D.H.M. Flow cytometry of platelets for clinical analysis. **Hematology/Oncology Clinics of North America**, Philadelphia, v. 16, n. 2, p. 421-454, 2002.
- BOUDREAUX, M.K.; LIPSCOMB, D.L. Clinical, biochemical, and molecular aspects of Glanzmann's thrombasthenia in humans and dogs. **Veterinary Pathology**, Middleton, v.38, p. 249-260, 2001.

BRAY, P.F; SHUMAN, M.A. Identification of an abnormal gene for the GPIIIa subunit of the platelet fibrinogen receptor resulting in Glanzmann's thrombasthenia. **Blood**, Washington, v.75, n.4, p. 881-888, 1990.

BUCHWALD, S. Characterization and partial purification of endothelial cell growth from human platelets. **The Journal of Clinical Investigation**, Thorofare, v. 73, n., p. 392-396, 1979.

BUSSEL, J. B.; KUNICK, T. J.; MICHELSON, A. D. Platelets: New understanding of platelet glycoproteins and their role in disease. **Hematology. American Society of Hematology. Education Program Book**. Washington, 2000. p. 222-240.

CARVER-MOORE, K. et al. Low levels of erythroid and myeloid progenitors in thrombopoietin and c-mpl-deficient mice. **Blood**, Washington, v. 88, p. 803-808, 1996.

CHEN, H. C.;et al. The platelet receptor GPVI mediates both adhesion and signaling responses to collagen in a receptor density-dependent fashion. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 277. n. 4, p.3011-3019, 2002.

CINES, D.B. et al. Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. **Blood**, Washington, v. 91, n.10, p. 3527-3561, 1998.

CLAY, D. et al. CD9 and megakaryocyte differentiation. **Blood**, Washington, v.97, n.7, p.1982-1989, 2001.

CLEMETSON, K.J.; CLEMETSON, J.M.. Platelet GPIb-V-IX complex: structure, function, physiology, and pathology. **Seminars in Thrombosis and Hemostasis**, New York, v.21, p.130-136, 1995.

COHN, R.J.; SHERMAN, G.G; GLENCROSS, D.K. Flow cytometric analysis of platelet surface glycoproteins in the diagnosis of Bernard-Soulier syndrome. **Pediatric Hematology Oncology**, London, v.14, n.1, p.43-50, 1997.

COLLER, B.S. et al. Immunological and biochemical characterization of homozygous and heterozygous Glanzmann thrombastenia in the Iraqi-Jewish and Arab populations of Israel: comparasion of techniques for carrier detection. **British Journal of Haematology**, Oxford, v.62, n.4, p.723-735, 1986.

COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. Red cells and bleeding disorders. In: \_\_\_\_\_ **Cotran Robbins pathologic basis of disease**. Philadelphia: WB Saunders, 1999. p.633-643.

CRAMER, E.M et al. Alpha-granule pool of glycoprotein IIb-IIIa in normal and pathologic platelets and megakaryocytes. **Blood**, Washington, v. 75, n. 6, p. 1220-1227, 1990.

DERMOT, K.et al. Naturally occurring mutations in glycoprotein Ib $\alpha$  that result in defective ligand binding and synthesis of a truncated protein. **Blood**, Washington, v.92, n.1, p.175-183, 1998.

DERMOT, K. The critical interaction of glycoprotein (GP) Ib $\beta$  with GPIX- genetic cause of Bernard-Soulier Syndrome. **Blood**, Washington, v. 93, n. 9, p. 2968-2975, 1999.

DERMOT, K.; MORATECK, P.A.; MONTGOMERY, R.R. The cysteine knot of platelet glycoprotein Ib $\beta$  (GPIb $\beta$ ) is critical for the interaction of GPIb $\beta$  with GPIX. **Blood**, Washington, v. 99, n. 12, p. 4428-4433, 2002.

Di PUMPO, M et al. Defective expression of GPIb/IX/V complex in platelets from patients with May-Hegglin anomaly and Sebastian syndrome. **Haematologica**, Pavia, v. 87, n. 9, p. 943-947, 2002.

DIAZ-RICART, M. et al. Antibodies to CD36 (GPIV) inhibit platelet adhesion to subendothelial surfaces under flow conditions. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, Baltimore, v. 16, p. 883-888, 1996.

DRACHMAN, J. G. Inherited thrombocytopenia: when a low platelet count does not mean ITP. **Blood**, Washington, v. 103, n.2, p 390-398. 2004.

DRAKE-WENCEL, J.D. Localization of internal pools of membrane glycoproteins involved in platelet adhesive responses. **American Journal Pathology**, Bethesda, v.124, n.2, p. 324-334, 1986.

DU, X.et al. Glycoproteins Ib and glycoproteins IX are fully complexed in the intact platelet membrane. **Blood**, Washington, v.69, n.5, p.1524-1527, 1987.

ESA, J J. Inherited giant platelet disorders. **European Journal of Haematology**. Copenhagen, v. 53, p. 191-196, 1994.

ESCOBAR, G; WHITE, G. Organization of von Willebrand factor on surface-activated platelets. **Arteriosclerosis and thrombosis : a journal of vascular biology**, Dallas, v.13, p.1852-1858, 1993.

FAUVEL-LAFÈVE, F. et al. Defective adhesion of blood platelets to vascular microfibrils in the Bernard-Soulier Syndrome. **Blood**, Washington, v. 82, n. 7, p.1985-1988, 1993.



FAVA, R.A. et al. Synthesis of transforming growth factor-beta1 by megacaryocytes and its localization to megakaryocytes and platelet alfa-granules. **Blood**, Washington, v. 76, n. 10, p. 1946-1955, 1990.

FENG, S. et al. Cytoplasmatic domains of GpIb $\alpha$  and GpIb $\beta$  regulate 14-3-3 $\zeta$  binding to GpIb/IX/V. **Blood**, Washington, v.95, n.2, p. 551-557, 2000.

FOX, J.E. Linkage of a membrane skeleton to integral membrane glycoproteins in human platelets. Identification of one of the glycoproteins as glycoprotein Ib. **Journal Clinical Investigation**, Thorofare, v. 75, p. 1673-1683, 1985.

FOX, J.E.; AGGERBECK, L. P.; BERNDT, M. C. Structure of the glycoprotein Ib, IX complex from platelet membranes. **The Journal Biological Chemistry**, Baltimore, v, 263, n.10, p. 4882-4890, 1988.

GAETANO, G. Historical overview of the role of platelets in hemostasis and thrombosis. **Haematologica**, Pavia, v. 86, n. 4, p. 349-356, 2001.

GARTNER, TK; BENNETT, J.S. The tetrapeptide analogue of the cell attachment site of fibronectin inhibits platelet aggregation and fibrinogen binding to activated platelets.  
**The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 260, n. 22, p. 11891-11894, 1985.

GEOFFREY, A.A.; BERTIL, G. Approach to the bleeding child. **Pediatric Clinics of North America**, Philadelphia, v. 49, n.6, p.1239-1256, 2002.

GEORGE, J. N.; CAEN, J.P.; NURDEN, A.T. Glanzmann's Thrombasthenia: The spectrum of clinical disease. **Blood**, Washington, v.75, n. 7, p.1383-1395, 1990.

GILES, C. The platelet count and mean platelet volume. **British Journal of Haematology**, Oxford, v. 48, p.31-37, 1981.

GIRMA, J-P; RIBBA, A-S; MEYER, D. Structure-function relationship of the A1 domain of Von Willebrand Factor. **Thrombosis and Haemostasis**, Stuttgart, v.74, n.1, p.156-160, 1995.

GLANZMANN, E. Hereditäre hämorrhägische thrombasthenie. Ein beitrag zur pathologie der blutplättchen. **Jahrbuch für Kinderheilkunde**, v. 88, p. 113-141, 1918.

GOICOECHEAT, S. et al.. The anti-adhesive activity of thrombospondin is mediated by the N-terminal domain of cell surface calreticulin. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 227, n.40, p. 37219-37228, 2002.

GONZALEZ-MANCHON, C. et al. Molecular genetic analysis of a compound heterozygote for the glycoprotein (GP) IIb gene associated with Glanzmann's thrombasthenia: Disruption of the 674-687 disulfide bridge in GPIIb prevents exposure of GPIIb-IIIa complexes. **Blood**, Washington, v. 93, n.3, p. 866-875, 1999.

GONZALEZ-MANCHON, C. et al. Disruption of the Cys5-Cys7 disulfide bridge in the platelet glycoprotein Ibbeta prevents the normal maturation and surface exposure of GPIb-IX complexes. **Thrombosis and Haemostasis**, Stuttgart, v.90, n.3, p.456-464, 2003.

GOTO, S. et al. Characterization of the unique mechanism mediating the shear-dependent binding of soluble von Willebrand factor to platelets. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 270. n. 40, p. 23352-23361, 1995.

GOUGH, N.R.; FAMBROUGH, D.M. Different steady state subcellular distributions of the three splice variants of lysosome-associated membrane protein LAMP-2 are determined largely by the COOH-terminal amino acid residue. **Journal of Cell Biology**, New York, v. 137, n.5, p. 1161-1169, 1997.

HOUREDILLÉ, P. et al. Studies on the megakaryocytes of a patient with the Bernard-Soulier syndrome. **British Journal of Haematology**, Oxford, v.76, p.521-530, 1990.

HARMENING, D.M.; LEMERY, L.D. Introduction to hemostasis. In: HARMENING, D.M. **Clinical hematology and fundamentals of hemostasis**, Philadelphia: F.A.Davis, 1997. p.481-508.

HICKERSON, D.H.M, BODE, A.P. Flow cytometry of platelets for clinical analysis. **Hematology/oncology clinics of North America**, Philadelphia, v. 16, n. 2. p. 421-454, 2002.

HILMANN, A et al. A novel hemizygous Bernard-Soulier Syndrome (BSS) mutation in the amino terminal domain of glycoprotein (GP) Ibbeta--platelet characterization and transfection studies. **Thrombosis and Haemostasis**, Stuttgart, v.88, n.6, p.1026-1032, 2002.

HOLMSEN, H; WEISS, H.J. Secretable storage pools in platelets. **Annual Review of Medicine**, Palo Alto, v. 30, p.119-134, 1979.

IKEDA Y.et al. The role of von Willebrand factor and fibrinogen in platelet aggregation under varying stress. **The Journal of Clinical Investigation**, Thorofare, v. 87, p. 1234-1240, 1991.

ISREALS, S.J. et al. Platelet dense granule membranes contain both granulophysin and P-selectin (GMP-140). **Blood**, Washington, v. 80, n. 1, p. 143-152, 1992.

ITALIANO JR., J.E. et al. Blood platelets are assembled principally at the ends of proplatelet processes produced by differentiated megakaryocytes. The **Journal of Cell Biology**, New York, v. 147, n. 6, p. 1299-1312. 1999.

JENNINGS, L.K. et al. Analysis of human platelet glycoproteins IIb-IIIa and Glanzmann's thrombasthenia in whole blood by flow cytometry. **Blood**, Washington, v.68, n.1, p. 173-179, 1986.

JANTUNEN, E. Inherited giant platelet disorders. **European Journal of Haematology**, Copenhagen, v. 53, p. 191-196, 1994.

KAHN, M.L. et al. Glycoprotein V-deficient platelets have undiminished thrombin responsiveness and do not exhibit a Bernard-Soulier phenotype. **Blood**, Washington, v. 94, n.12, p. 4112-4121, 1999.

KANNAN, M et al. Type I Glanzmann thrombasthenia: most common subtypes in North Indians. **American Journal of Hematology**, New York, v.74, n.2, p.139-141, 2003.

KAUSHANSKY, K. Thrombopoietin: The primary regulator of platelet function. **Blood**, Washington, v. 86. n.2, p.419-431, 1995.

KEHREL, B. et al. Glycoprotein VI is a major collagen receptor for platelet activation: It recognizes the platelet-activating quaternary structure of collagen, whereas CD36, glycoprotein IIb/IIIa, and von Willebrand factor do not. **Blood**, Washington, v. 91, n. 2, p. 491-499, 1998.

KENNY, D et al. The critical interaction of glycoprotein (GP) IBbeta with GPIX-a genetic cause of Bernard-Soulier syndrome. **Blood**, Washington, v.93, n.9, p. 2968-2975, 1999.

KEN, C. Interaction of blood with artificial surfaces. In: COLMANN, R.W. et al. **Hemostasis and thrombosis: basic principles and clinical practice**. Philadelphia: J.B. Lippincott, 1994. p. 1469-1485.

KING, G.L.; BUCHWALD, S. Characterization and partial purification of endothelial cell growth from human platelets. **The Journal of Clinical Investigation**, Thorofare, v. 73, n.2 , p.392-396, 1984.

KOTTKE-MARCHANT, K.; CORCORAN, G. The laboratory diagnosis of platelet disorders. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**, Chicago, v.126, n.2, p.133-146,2002.

KROLL, M.H.et al. Platelets and shear stress. **Blood**, Washington, v. 88, n.5, p. 1525-1541, 1996.

KUNISHIMA, S. et al. Missense mutations of the glycoprotein (GP) Ib beta gene impairing the GPIb alpha/beta disulfide linkage in a family with giant platelet disorder.**Blood**, Washington, v. 89, n.7, p. 2404-2412, 1997.

KUNISHIMA S, KAMIYA, T, SAITO, H. Genetic abnormalities of Bernard-Soulier syndrome. **International Journal of Hematology**, Charlottesville, v.76, n.4, p. 319-327, 2002.

KUTER, D. Megakaryopoiesis and thrombopoiesis. In: BEUTLER, E. et al. **Williams-hematology**, New York: McGraw-Hill, 2001. p.1339-1356.

KUNZENDORF. U.et al. T cells bind to the endothelial adhesion molecule GMP-140 p-selectin. **Transplantation**, Hagerstown, v. 56, p.1213-1217, 1993.

KUTER, D.; BEELER, D.L; ROSENBERG, R.D. The purification of megapoietin: a physiological regulator of megakaryocyte growth and platelet production. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 91, p.11104-11108, 1994.

LANZA F. et al. cDNA cloning and expression of platelet p24/CD9. Evidence for a new family of multiple membrane-spanning proteins. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 266, p.10638, 1991.

LI, C.Q et al. Expression of platelet glycoprotein (GP) V in heterologous cells and evidence for its association with GPIb alpha in forming a GPIb-IX-V complex on the cell surface. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 270, p. 16302-16307, 1995.

LÓPEZ, J.A. et al. Efficient plasma membrane expression of a functional platelet glycoprotein Ib-IX requires the presence of its 3 subunits. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 267, p. 12851-12859, 1992.

LÓPEZ, J.A.The platelet glycoprotein Ib-IX complex. **Blood Coagulation and Fibrinolysis**, London, v.5, n.1, p.97-119,1994.

LÓPEZ, J.A et al. Bernard-Soulier Syndrome. **Blood**, Washington, v. 91, n.12, p.4397-4418, 1998.

LOZANO, M et al. Glycoprotein IIb-IIIa and glycoprotein IV expression on Bernard-Soulier syndrome platelets. Comments. **Blood**, Washington, v.85, n.12, p.3763, 1995.

MARIAGRAZIA, De L.et al. Structure and function of the von Willebrand factor A1 domain: analysis with monoclonal antibodies reveals distinct binding sites involved in recognition of the platelet membrane glycoprotein Ib-IX-V complex and ristocetin-dependent activation. **Blood**, Washington, v.95, n. 1, p.164-172, 2000.

MARKOVITCH, O. et al. Severe juvenile vaginal bleeding due to Glanzmann's thrombasthenia: case report and review of the literature. **American Journal of Hematology**, New York, v.57, p.225-227, 1998.

MARTI,G.E. et al. Flow cytometric analysis of platelet surface antigens. **Cytometry**, Hoboken, v.9, p.448-455,1988.

MARTIGNETTI, J.A. et al. The gene for May-Hegglin anomaly Localizes to a <1-Mb region on chromosome 22q12.3-13.1 **The American Journal of Human Genetics**, Chicago, 66, p.1449-1454, 2000.

MARTIN, D. et al. Expression of an erythroid transcription factor in megakaryocytic and mast cell lineages. **Nature**, Hampshire, v.344, p.444-447, 1990.

MAZZINI, J.; HACKEL, C.; ANNICHINO-BIZZACCHI, J.M.. Allelic frequencies of three VNTRs in intron 40 of the human von Willebrand factor gene in types 1, 2, and 3 von Willebrand disease patients and controls of a Brazilian population. **Thrombosis Research**, Elmsford, v.100, n. 6, 489-494, 2000.

McCABE, M; JENNINGS, L.K. Basic introduction to platelets. In: \_\_\_\_\_. **Platelet protocol: research and clinical laboratory procedures**. San Diego: Academic Press, 1999. p.2-25; 42.

McEVER, R-P. Selectins: novel receptors that mediate leukocyte adhesion during inflammation. **Thrombosis and Haemostasis**, Stuttgart, v.65, n.3 p. 223-228, 1991.

McLAREN, M. Immunohistochemical localization of thrombospondin in human megakaryocytes and platelets. **Journal of Clinical Pathology**, London, v. 36, n.2, p.197-199, 1983.

MEYER, D.; GIMA, J.P. Von Willebrand factor: structure and function. **Thrombosis and Haemostasis**, Stuttgart, v.70, p. 99-104, 1993.

MHAWECH, P.; SALEEM, A. Inherited giant platelet disorders. **American Journal of Clinical Pathology**, Chicago, v. 113, p. 176-190, 2000.

MICHELSON, A.D. et al. Evaluation of platelet function by flow cytometry. **Methods**, San Diego, v. 21, n.3, p. 259-270, 2000.

MITSUI, T. et al. Severe tendency in a patient with Bernard-Soulier Syndrome associated with a homozygous single base pair deletion in the gene coding for the human platelet glycoprotein Ib $\alpha$ . **Journal of Pediatric Hematology/Oncology**, Hagerstown, v.20, n.3, p. 246-251, 1998.

MODDERMAN, P.W. et al. Glycoproteins V and Ib-IX form a noncovalent complex in the platelet membrane. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 267, n.1, p. 364-369, 1992.

MONCADA, S.; PALMER, R.M.; HIGGS, E.A. Nitric oxide: physiology, pathology, and pharmacology. **Pharmacological Reviews**, Bethesda, v, 43, n.2, p.109-142, 1991.

MOOG, S. et al. Platelet glycoprotein V binds to collagen and participates in platelet adhesion and aggregation. **Blood**, Washington, v.98, n.4, p. 1038-1046, 2001.

MORAN N. et al. Surface expression of glycoprotein Ib  $\alpha$  is dependent on glycoprotein Ib  $\beta$ : evidence from a novel mutation causing Bernard-Soulier syndrome. **Blood**, Washington, v.96, n.2, p.532-539, 2000.

MOREL-KOPP, MC et al. A Three amino acid deletion in glycoprotein IIIa is responsible for type I Glanzmann's thrombasthenia: Importance of residues Ile<sup>325</sup>Pro<sup>326</sup>Gly<sup>327</sup> for  $\beta$ 3 Integrin subunit association. **Blood**, Washington, v.90, n.2, p.669-677, 1997.

NEWMAN, P.J. Platelet GPIIb-IIIa: Molecular variations and alloantigens. **Thrombosis and Haemostasis**, Stuttgart, v. 66, n.1, p. 111-118, 1991.

NEWMAN, P.J. The molecular genetic basis of Glanzmann thrombasthenia in the Iraqui-Jewish and Arab populations in Israel. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 88, n.8, p. 3160-3164, 1991.

NODA et al. Heterogenous expression of glycoprotein Ib, IX, and V in platelets from two patients with Bernard-Soulier Syndrome caused by different genetic abnormalities. **Thrombosis and Haemostasis**, Stuttgart, v.74, n.6, p.1411-1415, 1995.

NURDEN, P. et al. Platelet ultrastructural abnormalities in three patients with type 2B von Willebrand disease. **British Journal of Haematology**, Oxford, v. 110, p. 704-714, 2000.

NURDEN, A.T. et al. Biochemistry and immunology of platelet membranes with reference to glycoprotein composition. **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, v.370, p.72-86, 1981.

PAINTER, R.G.; PRODOUZ, K.N. GAARDE, W. Isolation of a subpopulation of glycoprotein IIbIIIa from platelet membranes that is bound to membrane actin. **The Journal of Cell Biology**. New York, v.100, p. 652-657, 1985.

PARISE, L.V.; SMYTH, S.S; COLLIER, B.S. Platelet morphology, biochemistry, and function. In: WILLIAMS- BEUTLER, E.et al. **Williams- Hematology**, New York: McGraw-Hill, 2001. p. 1357-1408.

PERETZ, H. et al. Glanzmann's thrombasthenia associated with deletion-insertion and alternative splicing in the glycoprotein IIb gene. **Blood**, Washington, v.85, n.2, p. 414-420, 1995.

PHILIPS, D.R. et al. The platelet membrane glycoprotein in IIb-IIIa complex. **Blood**, Washington, v. 71, n. 4, p. 831-843, 1988.

PLOW, E.F. et al. The effect of Arg-Gly-Asp-containing peptides on fibrinogen and von Willebrand factor binding to platelets. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 82, n.23, p. 8057-8061, 1985.

PLOW, E.F; MARK, E.F, GINSBERG, H. The molecular basis of platelet function. In: HOFFMANN, R. et al. **Hoffmann hematology: basic principles and practice**. Philadelphia: Churchill Livingstone, 2000. p. 1741-1752.

RAMAKRISHNAN, V. et al. Increased thrombin responsiveness in platelets from mice lacking glycoprotein V. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.96, n.23, p. 13336-13341, 1999.

RAMAKRISHNAN, V. et al. A thrombin receptor function for platelet glycoprotein Ib-IX unmasked by cleavage of glycoprotein V. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 98, n. 4, p. 1823-1828, 2001.

RAVEL, R. Blood coagulation. In: RAVEL, RICHARD. **Clinical laboratory medicine**. St. Louis: Mosby, 1995. p.85- 112.

RETZINGER, G.S. Lab lines. Glanzmann thrombasthenia.v.7,n.5,2001.Disponível em: <http://www.med.uc.edu/departme/pathdept/web/lablines/lablines.htm>. Acesso em 08/09/03.

RICHARD, E.; KLIEGMAN, JENSON, H. B. Disorders of the platelets and the blood vessels. In: RICHARD, E.; KLIEGMAN, JENSON, H. B. **Nelson textbook of pediatrics**. St. Louis: W. B. Saunders, 2000. p.1520-1527.

RINDER, M.R.; RICHARD, R.R.; RINDER, R.R Acquired von Willebrand's disease: a concise review. **American Journal of Hematology**, New York, v.54, p.139-145, 1997.

ROEST, M. et al. Platelet adhesion to collagen in healthy volunteers is influenced by variation of both  $\alpha 2\beta 1$  density and von Willebrand factor. **Blood**, Washington, v.96, n.4, p.1433-1437, 2000.

ROSENBERG, N. et al. Glanzmann thrombasthenia caused by an 11.2-kb deletion in the glycoprotein IIIa ( $\beta_3$ ) is a second mutation in Iraqi Jews that stemmed from a distinct founder. **Blood**, Washington, v. 89, n. 10, p. 3654-3662, 1997.

RUGGERI, Z. Perspectives series: Cell adhesion in vascular biology. **Journal Clinical Investigation**, Thorofare, v. 99, n.4, p.559-564, 1997.

RYO, R. et al. New synthesis of a platelet specific protein: Platelet factor 4 synthesis in a megakaryocyte-rabbit enriched bone marrow culture system. **The Journal of Cell Biology**, New York, v.96, n. 2, p. 515-520, 1983.

SADLER, J.E. Von Willebrand factor. **The Journal Biological Chemistry**, Baltimore, v. 266, n. 22, p.777-780, 1991.

SAE-TUNG, G.; JING-FEI, D.; LOPEZ, J.A. Biosynthetic defect in platelet glycoprotein IX mutants associated with Bernard-Soulier Syndrome. **Blood**, Washington, v. 87, n. 4, p. 1361-1367, 1996.

SAVOIA, A. et al. Autosomal dominant macrothrombocytopenia in Italy is most frequently a type of heterozygous Bernard-Soulier syndrome. **Blood**, Washington, v. 97, n.5, p. 1330-1335, 2001.

SHAPIRO, H.M. Overture. In: \_\_\_\_\_. **Practical flow cytometry**, New York: Wiley-Liss, 1995. p. 1-32.

SHARP, W.J.; KHANDURI, U.D.; CHRISTIE, B.S. Rapid heterozygote detection in Glanzmann's thrombasthenia. **British Journal of Haematology**, Oxford, v.101, n.1, p. 66-69, 1998.

SCHATTIL, S.J.; CUNNINGHAM, M.; HOXIE, J.A. Detection of activated platelets in whole blood using activation-dependent monoclonal antibodies and flow cytometry. **Blood**, Washington, v. 70, n.1, p. 307-315, 1987.



SCHIMITZ, G. et al. European working group on clinical cell analysis: Consensus protocol for the flow cytometric characterization of platelet function. **Thrombosis and Haemostasis**, Stuttgart, v. 96, p. 888, 1998.

SCHUMAN, M. Hemorrhagic disorders: Abnormalities of platelet and vascular function. In: \_\_\_\_\_. Goldman: **Cecil textbook of medicine**. 21.ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 2000. p. 996-1004.

SLUPSKY, J.R. et al. Analysis of CD9, CD32, and p67 signalling: use of degranulated platelets indicates direct involvement of CD9 and p67 in integrins activation. **British Journal of Haematology**, London, v.96, n.2, p.275-286, 1997.

TANDON, N.N. et al. Isolation and characterization of platelet glycoprotein IV (CD36). **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 264, n. 13, p. 7570-7575, 1989.

TAO, J. et al. A novel (288delC) mutation in exon 2 of GPIIb associated with type I Glanzmann's thrombasthenia. **British Journal of Haematology**, London, v.111, p.96-101, 2000.

TAYLOR, S.L. et al. Evaluation of an automated screening assay for von Willebrand disease type 2N. **Clinical and Laboratory Haematology**, Oxford, v.24, n. 6, p. 369-375, 2002.

THIBERT, V. et al. Quantitation of platelet glycoprotein IV (CD36) in healthy subjects and in patients with thrombocythemia using an immunocapture assay. **Thrombosis and Haemostasis**, Stuttgart, v. 68, p. 600-605, 1992.

TOMER, A. et al. Bernard-Soulier Syndrome: quantitative characterization of megakaryocytes and platelets by flow cytometric and platelet kinetic measurements. **European Journal of Haematology**, Copenhagen, v.52, p.193-200, 1994.

TUSZYNSKI, G.P. et al. The interaction of human platelet thrombospondin with fibrinogen. Thrombospondin purification and specificity of interaction. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 260, n. 22, p. 12240-12245, 1985.

VIGON, I. et al. Molecular cloning and characterization of MPL, the human homolog of the v-mpl oncogene: Identification of a member of the hematopoietic growth receptor superfamily. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 89, p. 5640-5644, 1992.

WALSH, P.N. Platelet-coagulant protein interactions. In: COLMANN, R.W et al. **Hemostasis and thrombosis: basic principles and clinical practice**. Philadelphia: J.B. Lippincott, 1994. p.629-651.

WANG, Q. et al. Changes in the biochemical properties of neutrophils and endothelial cells during adhesion. **Blood**, Washington, v. 97, n.3, p.660-668, 2001

WARE, J. et al. Nonsense mutation in the glycoprotein Ib $\alpha$  coding sequence associated with Bernard-Soulier syndrome. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.87, p. 2026-2030, 1990.

WEI-MIN, M. et al. CD36 associates with CD9 and integrins on human blood platelets. **Blood**, Washington, v. 97, n.6, p.1689-1696, 2001.

WENCEL-DRAKE, J.D et al. Localization of internal pools of membrane glycoproteins involved in platelet adhesive responses. **The American Journal of Pathology**, Bethesda, v.124, p.324-334,1986.

WENCHE, J. et al. Platelet aggregates as marker of platelet activation: Characterization of flow cytometric method suitable for clinical applications. **American Journal of Hematology**, New York, v. 57, p. 33-42, 1998.

WHITE, J.G. Anatomy and structural organization of the platelets. In: COLMAN, R.W et al. **Hemostasis and thrombosis: basic principles and clinical practice**. Philadelphia: J.B. Lippincott, 1994. p.397-413.

WORTHINGTON, R.;Roger ; CARROL, C; Boucheix, C. Platelet activation by CD9 monoclonal antibodies is mediated by the Fc $\gamma$ II receptor. **British Journal of Haematology**, Oxford, v.74, n. 2, p.216-222, 1990.

WRIGHT, J.H. The origin and nature of the blood plates. **The Boston Medical Surgical Journal**, Boston, v. 23, p. 643, 1906.

WRIGHT, J.H. The histogenesis of blood platelets. **Journal of Morphology**, Philadelphia, v. 21, p.263, 1906.

WRIGHT, S.D. et al. Double heterozygosity in the platelet glycoprotein IX gene in the three siblings with Bernard-Soulier Syndrome. **Blood**, Washington, v. 81, n. 9, p. 2339-2347, 1993.

WU, G et al. Human endothelial cells in culture and in vivo express on their surface all four components of the glycoprotein Ib/IX/V complex. **Blood**, Washington, v. 90, n. 7, p. 2660-2669, 1997.

YANG, S. et al. Requirement of leucine-rich repeats of glycoprotein (GP) Ib $\alpha$  for shear-dependent and binding of von Willebrand factor to platelet membrane GPIb-IX-V complex. **Blood**, Washington, v. 95, n. 3, p. 903-910, 2000.

ZUCKER-FRANKLIN, D. Megakaryocyte and platelet structure. In: Hoffmann, R., et al. **Hoffmann hematology: basic principles and practice**. Philadelphia: Churchill Livingstone, 2000. p.1730-1740.

## **APÊNDICES**

APÊNDICE 1 - DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DE PACIENTES COM SBS

APÊNDICE 2 - DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DE PACIENTES COM TG

APÊNDICE 3 - RESULTADOS DA CITOMETRIA DE FLUXO PACIENTE SBS 1

APÊNDICE 4 - RESULTADOS DA CITOMETRIA DE FLUXO PACIENTE SBS 2

APÊNDICE 5 - RESULTADOS DA CITOMETRIA DE FLUXO PACIENTE SBS 3

APÊNDICE 6 - RESULTADOS DA CITOMETRIA DE FLUXO PACIENTE SBS 4

APÊNDICE 7 - RESULTADOS DA CITOMETRIA DE FLUXO PACIENTE SBS 5

APÊNDICE 8 - RESULTADOS DA CITOMETRIA DE FLUXO PACIENTE SBS 6

APÊNDICE 9 - RESULTADOS DA CITOMETRIA DE FLUXO PACIENTE SBS 7

APÊNDICE 10 - RESULTADOS DA CITOMETRIA DE FLUXO PACIENTE SBS 8

APÊNDICE 11 - RESULTADOS DA CITOMETRIA DE FLUXO PACIENTE SBS 9

APÊNDICE 12 - RESULTADOS DA CITOMETRIA DE FLUXO PACIENTE SBS  
10

APÊNDICE 13 - RESULTADOS DA CITOMETRIA DE FLUXO PACIENTE SBS  
11

APÊNDICE 14 - RESULTADOS DA CITOMETRIA DE FLUXO PACIENTE SBS  
12

APÊNDICE 15 - RESULTADOS DA CITOMETRIA DE FLUXO PACIENTE SBS  
13

APÊNDICE 16 - RESULTADOS DA CITOMETRIA DE FLUXO PACIENTE SBS  
14

APÊNDICE 17 - RESULTADOS DA CITOMETRIA DE FLUXO PACIENTE SBS  
15

APÊNDICE 18 - RESULTADOS DA CITOMETRIA DE FLUXO PACIENTE TG 1

APÊNDICE 19 - RESULTADOS DA CITOMETRIA DE FLUXO PACIENTE TG 2

APÊNDICE 20 - RESULTADOS DA CITIOMETRIA DE FLUXO PACIENTE TG 3

APÊNDICE 21 - RESULTADOS DA CITIOMETRIA DE FLUXO PACIENTE TG 4

APÊNDICE 22 - RESULTADOS DA CITIOMETRIA DE FLUXO PACIENTE TG 5

APÊNDICE 23 - NORMALIDADE ADULTO -CD42a

APÊNDICE 24 - NORMALIDADE ADULTO -CD42b

APÊNDICE 25 - NORMALIDADE ADULTO –CD61

APÊNDICE 26 - NORMALIDADE ADULTO –CD41a

APÊNDICE 27 - NORMALIDADE CRIANÇA –CD42a

APÊNDICE 28 - NORMALIDADE CRIANÇA –CD42b

APÊNDICE 29 - NORMALIDADE CRIANÇA –CD61

APÊNDICE 30 - NORMALIDADE CRIANÇA –CD41a

## APÊNDICE 1 - DADOS DE IDENTIFICAÇÃO

### PACIENTES COM SÍNDROME DE BERNARD-SOULIER

Número	Iniciais	Sexo	Idade	Raça	Hospital
1	FLP	38	M	BRANCA	HC
2	EMPR	4	F	BRANCA	HIPP
3	ASJ	3	M	BRANCA	HC
4	DAV	22	M	BRANCA	HC
5	NDR	7	F	BRANCA	HIPP
6	SAA	34	F	MULATA	HC
7	PNS	21	F	BRANCA	HIPP
8	LSB	6	F	BRANCA	HIPP
9	SRS	4	F	BRANCA	HC
10	EFG	4	F	BRANCA	HIPP
11	VPS	18	M	BRANCA	HC
12	BFM	17	F	BRANCA	HIPP
13	DJS	45	F	BRANCA	HC
14	VS	22	M	BRANCA	HC
15	RAA	17	F	BRANCA	HC

## APÊNDICE 2 - DADOS DE IDENTIFICAÇÃO

### PACIENTES COM TROMBASTENIA DE GLANZMANN

Número	Iniciais	Sexo	Idade	Raça	Hospital
1	EC	25	F	BRANCA	HC
2	FST	3	M	BRANCA	HC
3	EC	16	F	BRANCA	HC
4	JA	17	F	BRANCA	HE
5	MVF	14	M	BRANCA	HC
6	ACK	13	M	BRANCA	HC

HC: Hospital de Clínicas; HE: Hospital Evangélico; HIPP: Hospital Infantil Pequeno Príncipe

### APÊNDICE 3 - CITOMETRIA DE FLUXO PACIENTE-1 (FP)- SBS

CD9

Data coleta	Média pico	MnX	MdX	Mínimo	Máximo	%
08/04/03	55,0	69,8	66,2	4,09	996,7	96,0

CD42a

Data coleta	Média pico	MnX	MdX	Mínimo	Máximo	%
08/04/03	0	0	0	0	0	0

CD42b

Data coleta	Média pico	MnX	MdX	Mínimo	Máximo	%
08/04/03	0	0	0	0	0	0

CD36

Data	Média pico	MnX	MdX	Mínimo	Máximo	%
08/04/03	57,0	19,6	19,4	2,07	204,7	99,8

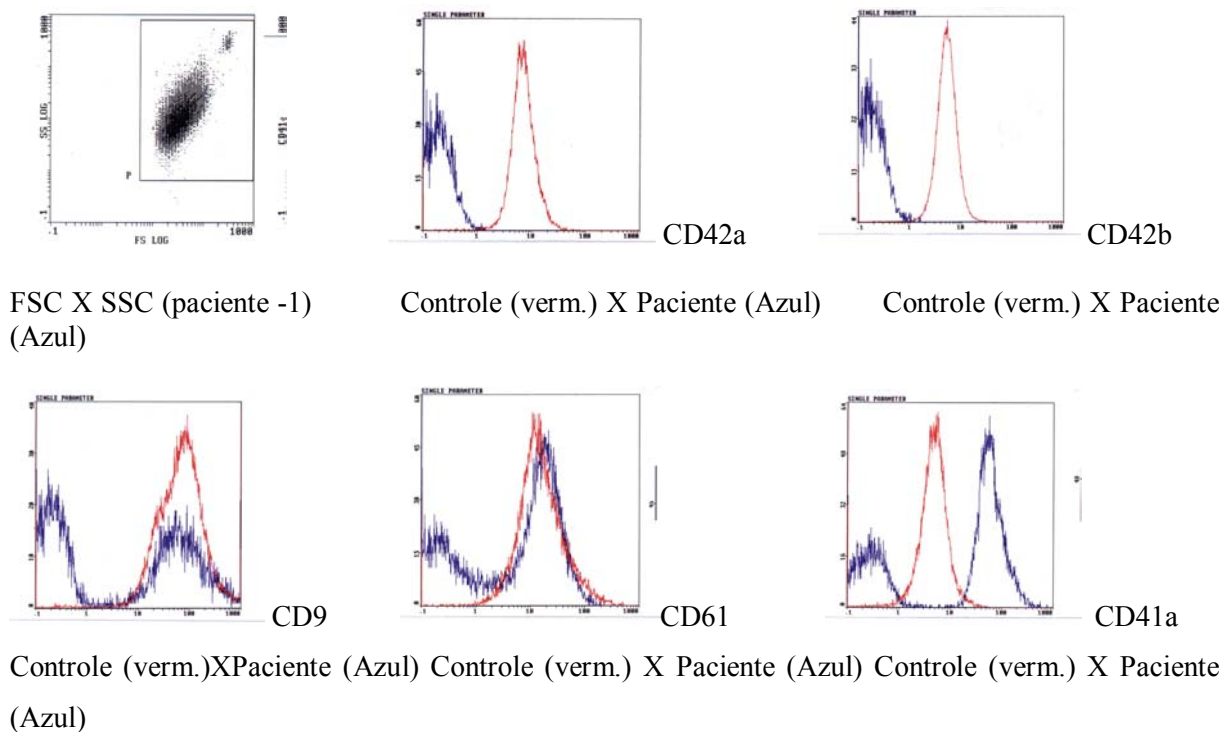
CD61

Data	Média pico	MnX	MdX	Mínimo	Máximo	%
08/04/03	59,0	16,5	15,9	2,30	167,9	99,9

CD41a

Data	Média pico	MnX	MdX	Mínimo	Máximo	%
08/04/03	64,0	64,1	59,9	10,2	602,3	99,0

FIGURA 2 - GRÁFICOS DE FLUORESCÊNCIA E FSC (TAMANHO) X SSC (COMPLEXIDADE) PACIENTE 1



APÊNDICE 4 - CITOMETRIA DE FLUXO PACIENTE-2 (ER)-SBS  
CD9

Data coleta	Média pico	MnX	MdX	Mínimo	Máximo	%
07/04/03	56,0	39,9	34,9	3,81	894,8	99,7

CD42a

Data coleta	Média pico	MnX	MdX	Mínimo	Máximo	%
07/04/03	0	0	0	0	0	0

CD42b

Data	Média pico	MnX	MdX	Mínimo	Máximo	%
07/04/03	0	0	0	0	0	0

CD36

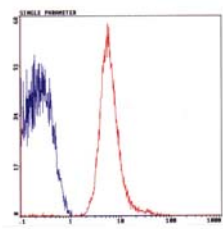
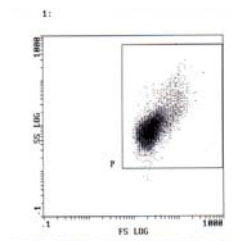
Data	Média pico	MnX	MdX	Mínimo	Máximo	%
07/04/03	47,0	5,50	6,03	0,252	54,1	99,8

CD61

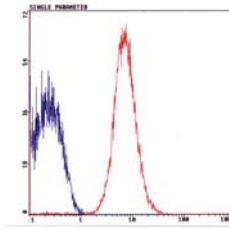
Data	Média pico	MnX	MdX	Mínimo	Máximo	%
07/04/03	68,0	39,1	35,9	4,90	607,8	88,3

CD41a

Data	Média pico	MnX	MdX	Mínimo	Máximo	%
07/04/03	61,0	8,69	9,66	0,741	40,5	99,8



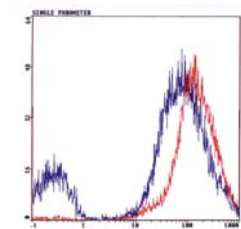
CD42a



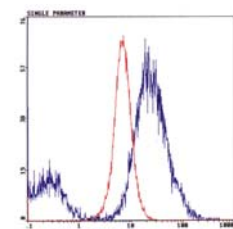
CD42b

FSC X SSC (paciente -2) Controle (verm.) X Paciente (Azul)

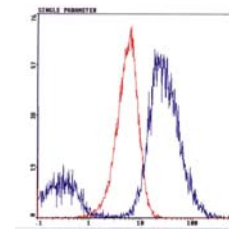
Controle (verm.) X Paciente



CD9



CD61



CD41a

Controle (verm.)XPaciente (Azul) Controle (verm.)XPaciente (Azul) Controle (verm.)X Paciente (Azul)



APÊNDICE 5 - CITOMETRIA DE FLUXO PACIENTE-3 (RA)-SBS  
CD9

Data coleta	Média pico	MnX	MdX	Mínimo	Máximo	%
14/05/03	77,0	38,0	35,7	3,81	550,5	99,6

CD42a

Data coleta	Média pico	MnX	MdX	Mínimo	Máximo	%
14/05/03	0	0	0	0	0	0

CD42b

Data coleta	Média pico	MnX	MdX	Mínimo	Máximo	%
14/05/03	0	0	0	0	0	0

CD36

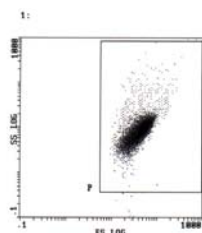
Data coleta	Média pico	MnX	MdX	Mínimo	Máximo	%
14/05/03	106,0	9,42	9,99	0,702	62,4	99,6

CD61

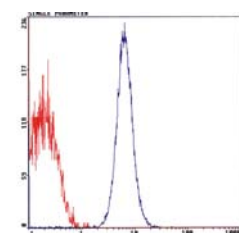
Data coleta	Média pico	MnX	MdX	Mínimo	Máximo	%
14/05/03	95,0	27,3	26,7	1,10	364,0	90,3

CD41a

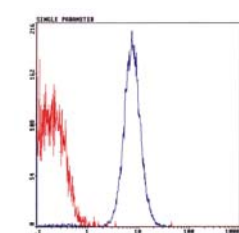
Data coleta	Média pico	MnX	MdX	Mínimo	Máximo	%
14/05/03	111,0	11,2	11,9	1,04	48,5	99,7



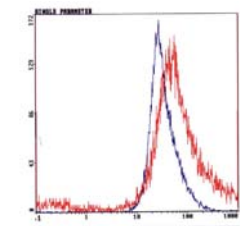
FSC X SSC (paciente-3)  
(verm.)



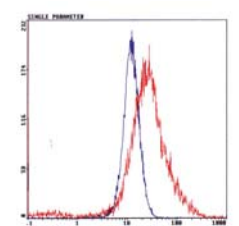
Controle (azul) X Paciente (vermelho)



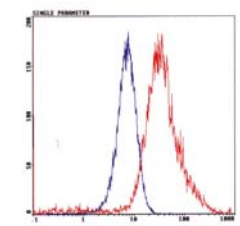
Controle (azul) X Paciente



CD9



CD61



CD41a

Control. (azul)XPac(vermelho) Controle (azul) X Paciente (vermelho) Controle (azul) X Paciente  
(verm.)

# APÊNDICE 6 - CITOMETRIA DE FLUXO PACIENTE-4 (AS)-SBS

CD9

Data coleta	Média pico	MnX	MdX	Mínimo	Máximo	%
23/04/03	73,0 hetero	8,31	9,15	0,271	130,9	84,1

CD42a

Data coleta	Média pico	MnX	MdX	Mínimo	Máximo	%
23/04/03	147,0	6,29	6,36	1,29	31,0	82,0

CD42b

Data coleta	Média pico	MnX	MdX	Mínimo	Máximo	%
23/04/03	84,4 hetero	2,93	3,35	0,266 h	22,4	81,5

CD36

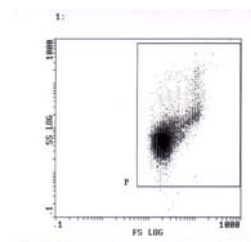
Data coleta	Média pico	MnX	MdX	Mínimo	Máximo	%
23/04/03	112,0	18,4	19,7	1,90	125,9	87,2

CD61

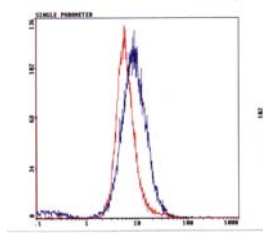
Data coleta	Média pico	MnX	MdX	Mínimo	Máximo	%
23/04/03	125,0	13,8	14,6	0,855	87,9	85,8

CD41a

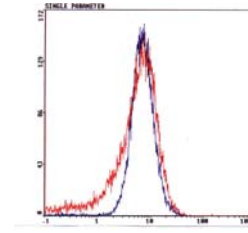
Data coleta	Média pico	MnX	MdX	Mínimo	Máximo	%
23/04/03	94,4	10,3	11,1	0,877	76,1	88,0



FSC X SSC (paciente-4)  
(Azul)

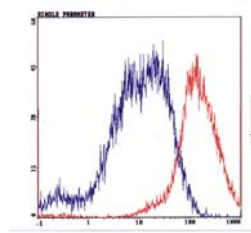


CD42a

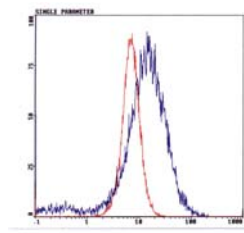


CD42b

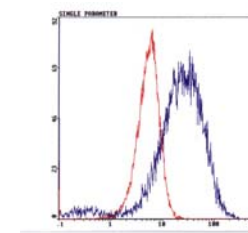
Control (verm.) X Paciente



CD9



CD61



CD41a

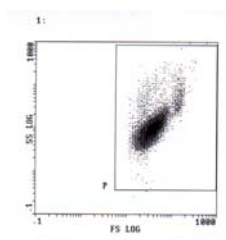
Control (verm.)XPaciente (Azul)  
(Azul)

Control (verm.) X Paciente (Azul)

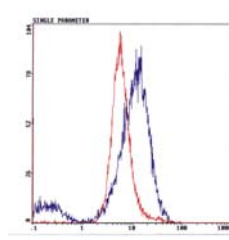
Control (verm.) X Paciente

APÊNDICE 7 - CITOMETRIA DE FLUXO PACIENTE-5 (NR)-SBS  
CD9

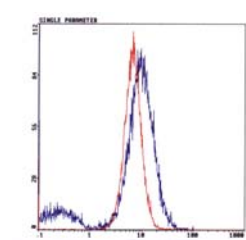
Data coleta	Média pico	MnX	MdX	Mínimo	Máximo	%
11/04/03	58,0	1,14	0,934	0,104	201,0	99,0
CD42a						
Data coleta	Média pico	MnX	MdX	Mínimo	Máximo	%
11/04/03	101,0	11,3	11,9	1,06	71,8	66,3
CD42b						
Data coleta	Média pico	MnX	MdX	Mínimo	Máximo	%
11/04/03	73,0	11,3	12,6	0,796	123,7	66,8
CD36						
Data coleta	Média pico	MnX	MdX	Mínimo	Máximo	%
11/04/03	104,0	44,5	43,8	5,76	384,2	82,5
CD61						
Data coleta	Média pico	MnX	MdX	Mínimo	Máximo	%
11/04/03	68,0	18,1	18,5	1,20	223,9	99,9
CD41a						
Data coleta	Média pico	MnX	MdX	Mínimo	Máximo	%
11/04/03	128,0	68,2	67,4	15,8	476,7	99,9



FSC X SSC (paciente -5) Controle (verm.) X Paciente (Azul)  
(Azul)

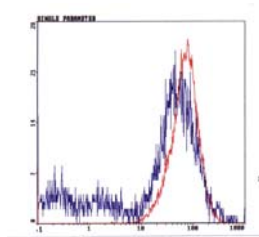


CD42a

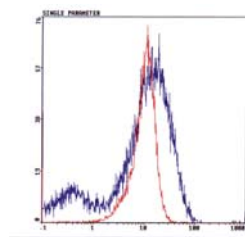


CD42b

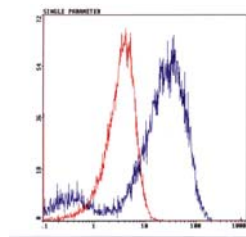
Controle (verm.) X Paciente



CD9



CD61

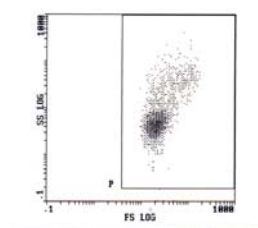


CD41a

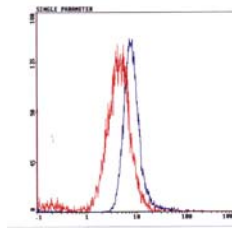
Controle (verm.)XPaciente (Azul) Controle (verm.)XPaciente (Azul) Controle (verm.) X Paciente  
(Azul)

APÊNDICE 8 - CITOMETRIA DE FLUXO PACIENTE-6 (VS)-SBS  
CD9

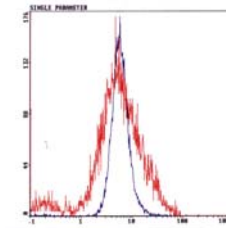
Data coleta	Média pico	MnX	MdX	Mínimo	Máximo	%
07/10/03	104,0	38,5	41,9	2,26	320,9	98,3
CD42a						
Data coleta	Média pico	MnX	MdX	Mínimo	Máximo	%
07/10/03	99,0	3,03	3,18	0,367	18,7	99,9
CD42b						
Data coleta	Média pico	MnX	MdX	Mínimo	Máximo	%
07/10/03	46,0	6,24	6,55	0,555	43,6	99,7
CD36						
Data coleta	Média pico	MnX	MdX	Mínimo	Máximo	%
07/10/03	96,0	24,3	26,2	1,44	187,1	99,8
CD61						
Data coleta	Média pico	MnX	MdX	Mínimo	Máximo	%
07/10/03	92,0	26,2	22,8	4,64	391,1	87,0
CD41a						
Data coleta	Média pico	MnX	MdX	Mínimo	Máximo	%
07/10/03	125,0	28,9	29,8	2,86	164,9	99,7



FSC X SSC (paciente- 6) Controle (azul) X Paciente (vermelho) (vermelho)

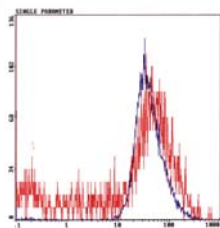


CD42a



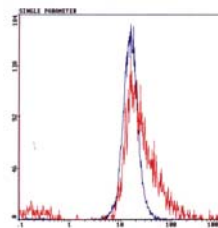
CD42b

Controle (azul) X Paciente



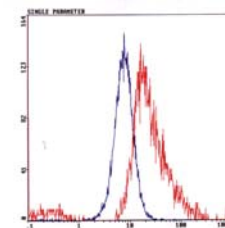
CD9

Controle(azul)XPaciente(vermelho) (verm.)



CD61

Controle(azul)XPaciente(vermelho)



CD41a

Controle(azul)XPaciente

APÊNDICE 9 - CITOMETRIA DE FLUXO PACIENTE-7 (DS)- SBS  
CD9

Data coleta	Média pico	MnX	MdX	Mínimo	Máximo	%
07/10/03	104,0	38,5	41,9	2,26	320,9	98,3

CD42a

Data coleta	Média pico	MnX	MdX	Mínimo	Máximo	%
07/10/03	99,0	3,03	3,18	0,367	18,7	99,9

CD42b

Data coleta	Média pico	MnX	MdX	Mínimo	Máximo	%
07/10/03	46,0	6,24	6,55	0,555	43,6	99,7

CD36

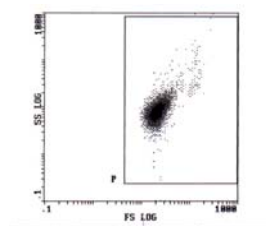
Data coleta	Média pico	MnX	MdX	Mínimo	Máximo	%
07/10/03	96,0	24,3	26,2	1,44	187,1	99,8

CD61

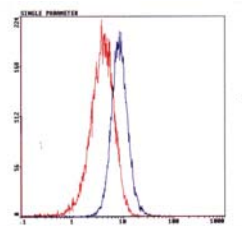
Data coleta	Média pico	MnX	MdX	Mínimo	Máximo	%
07/10/03	92,0	26,2	22,8	4,64	391,1	87,0

CD41a

Data coleta	Média pico	MnX	MdX	Mínimo	Máximo	%
07/10/03	125,0	28,9	29,8	2,86	164,9	99,7

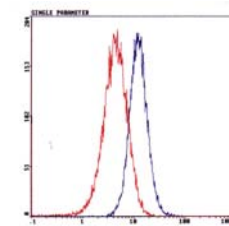


FSC X SSC (paciente- 7)



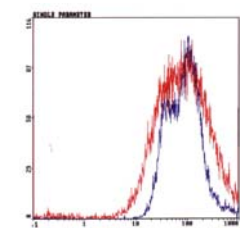
CD42a

Controle (azul) X Paciente (vermelho)



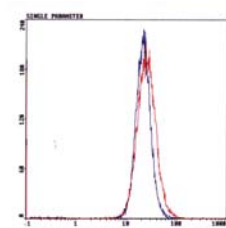
CD42b

Controle (azul) X Paciente



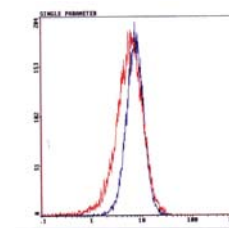
CD9

Controle (azul) X Pac. (vermelho)



CD61

Controle (azul)XPaciente (vermelho)

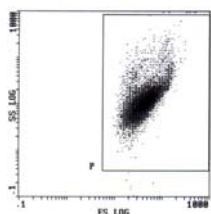


CD41a

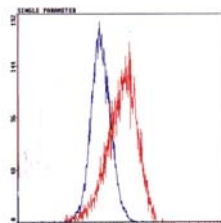
Controle (azul) X Paciente (verm.)

APÊNDICE 10 - CITOMETRIA DE FLUXO PACIENTE-8 (LB)- SBS  
CD9

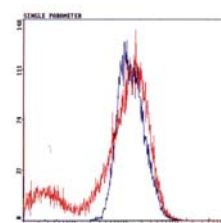
Data coleta	Média pico	MnX	MdX	Mínimo	Máximo	%
07/05/03	55,0 hetero	1,42	1,27	0,104	77,5	72,6
CD42a						
Data coleta	Média pico	MnX	MdX	Mínimo	Máximo	%
07/05/03	58,0	10,2	10,9	0,887	51,2	55,5
CD42b						
Data coleta	Média pico	MnX	MdX	Mínimo	Máximo	%
07/05/03	78,0	11,5	12,5	0,988	105,2	82,4
CD36						
Data coleta	Média pico	MnX	MdX	Mínimo	Máximo	%
07/05/03	74,0 hetero	3,23	4,10	0,104	60,2	99,8
CD61						
Data coleta	Média pico	MnX	MdX	Mínimo	Máximo	%
07/05/03	101,0	43,0	39,4	5,08	683,2	99,8
CD41a						
Data coleta	Média pico	MnX	MdX	Mínimo	Máximo	%
07/05/03	97,0	48,4	43,2	5,36	832,6	99,9



FSC X SSC (paciente-8) Controle (azul) X Paciente (vermelho) (vermelho)

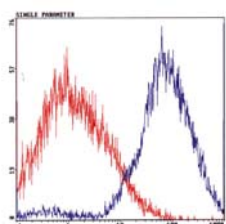


CD42a



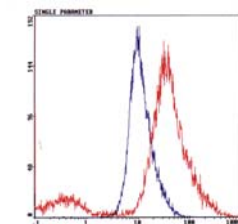
CD42b

Controle (azul) X Paciente

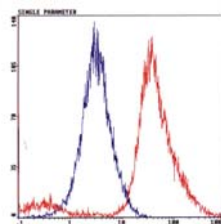


CD9

Controle (azul) X Pac. (vermelho) Controle (azul) X Paciente (vermelho)



CD61



CD41a

Controle (azul) X Pac.

APÊNDICE 11 - CITOMETRIA DE FLUXO PACIENTE-9 (SO)-SBS

# CD9

Data coleta	Média pico	MnX	MdX	Mínimo	Máximo	%
16/06/03	177,2	196,3	187,4	19,6	996,7	93,9

# CD42a

Data coleta	Média pico	MnX	MdX	Mínimo	Máximo	%
16/06/03	36,0	13,8	12,6	2,22	291,0	75,4

# CD42b

Data coleta	Média pico	MnX	MdX	Mínimo	Máximo	%
16/06/03	166,0	40,4	38,4	5,76	734,1	92,1

# CD36

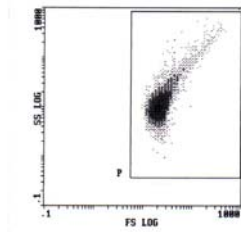
Data coleta	Média pico	MnX	MdX	Mínimo	Máximo	%
16/06/03	112,0	92,3	89,2	13,4	788,9	89,9

# CD61

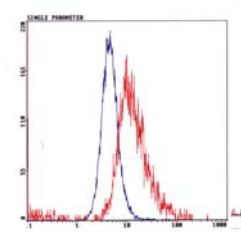
Data coleta	Média pico	MnX	MdX	Mínimo	Máximo	%
16/06/03	65,0	27,8	26,2	2,91	521,6	99,3

# CD41a

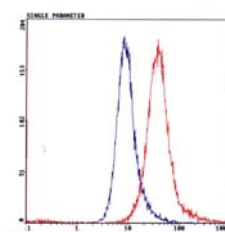
Data coleta	Média pico	MnX	MdX	Mínimo	Máximo	%
16/06/03	54,0	17,8	17,6	1,20	384,2	99,4



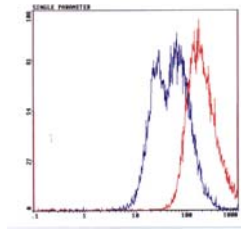
FSC X SSC (paciente-9)  
(Azul)



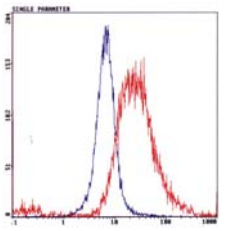
CD42a  
Controle (verm.) X Paciente (Azul)



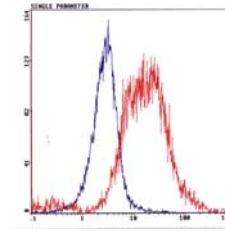
CD42b  
Controle (verm.) X Pac.



CD9  
Controle (verm.) X Paciente (Azul)



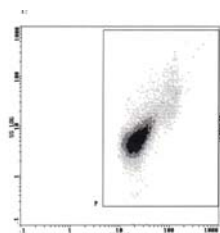
CD61  
Controle (verm.) X Paciente (Azul)



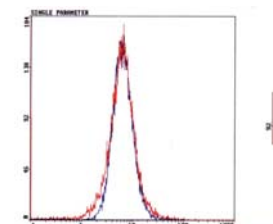
CD41a  
Controle (verm.) X Pac.(Azul)

APÊNDICE 12 - CITOMETRIA DE FLUXO PACIENTE-10 (DV)-SBS  
CD9

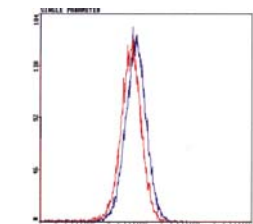
Data coleta	Média pico	MnX	MdX	Mínimo	Máximo	%
15/04/03	166,0	34,9	34,7	5,86	249,5	95,0
CD42a						
Data coleta	Média pico	MnX	MdX	Mínimo	Máximo	%
15/04/03	207,0	8,27	8,24	1,73	43,6	94,1
CD42b						
Data coleta	Média pico	MnX	MdX	Mínimo	Máximo	%
15/04/03	181,0	8,58	8,61	1,58	38,4	93,8
CD36						
Data coleta	Média pico	MnX	MdX	Mínimo	Máximo	%
15/04/03	60,0 hetero	1,89	2,11	0,104	44,4	76,6
CD61						
Data coleta	Média pico	MnX	MdX	Mínimo	Máximo	%
15/04/03	180,0	19,4	19,2	3,38	123,7	93,7
CD41a						
Data coleta	Média pico	MnX	MdX	Mínimo	Máximo	%
15/04/03	153,0	10,4	10,4	1,27	81,8	93,6



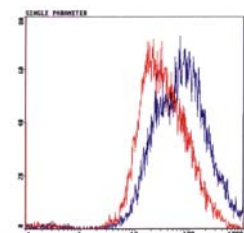
FSC X SSC (paciente -6)  
(Azul)



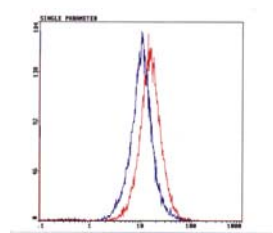
CD42a  
Controle (verm.) X Paciente (Azul)



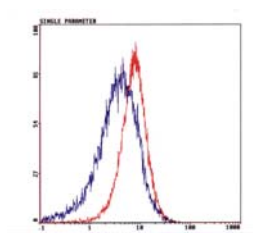
CD42b  
Controle (verm.) X Paciente



CD9  
Controle (verm.)XPaciente (Azul)



CD61  
Controle (verm.) X Paciente (Azul)



CD41a  
Controle (verm.) X Paciente



# APÊNDICE 13 - CITOMETRIA DE FLUXO PACIENTE-11 (SA)-SBS

## CD42a

Data coleta	Média pico	MnX	MdX	Mínimo	Máximo	%
02/06/03	112,0	16,5	15,9	4,24	84,0	50,3

## CD42b

Data coleta	Média pico	MnX	MdX	Mínimo	Máximo	%
02/06/03	90,0	15,9	15,4	2,30	112,0	81,6

## CD36

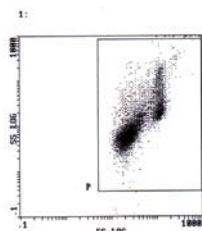
Data coleta	Média pico	MnX	MdX	Mínimo	Máximo	%
02/06/03	65,0	26,1	28,6	1,04	424,1	86,41

## CD61

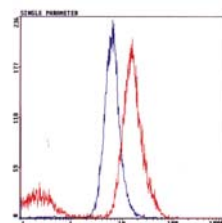
Data coleta	Média pico	MnX	MdX	Mínimo	Máximo	%
02/06/03	67,0	19,7	19,5	2,30	185,4	80,0

## CD41a

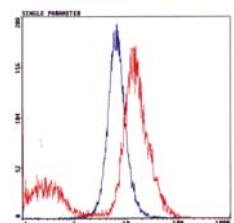
Data coleta	Média pico	MnX	MdX	Mínimo	Máximo	%
02/06/03	56,0	14,7	15,4	1,18	125,9	89,0



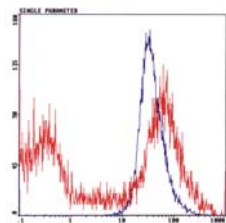
FSC X SSC (paciente-6) vermelho)



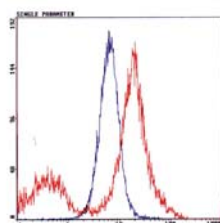
Controle (azul) X Paciente (vermelho)



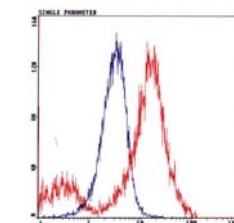
Controle (azul) X Pac.



Controle (azul)XPaciente (vermelho)



Controle (verm.)XPaciente (vermelho)



Controle (azul)XPac. (verm.)

# APÊNDICE 14 - CITOMETRIA DE FLUXO PACIENTE-12 (PS)-SBS

## CD9 2 picos

Data coleta	Média pico	MnX	MdX	Mínimo	Máximo	%
05/05/03	28,0 2 pops	31,9	44,5	0,576	431,8	61,4

## CD42a

Data coleta	Média pico	MnX	MdX	Mínimo	Máximo	%
05/05/03	119,0	18,9	18,9	3,24	111,0	69,9

## CD42b

Data coleta	Média pico	MnX	MdX	Mínimo	Máximo	%
05/05/03	111,0	9,82	9,84	1,16	60,8	65,6

## CD36

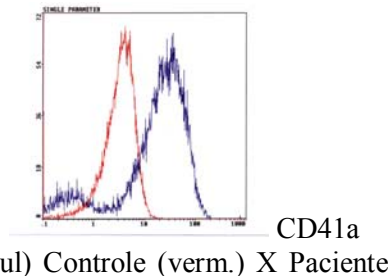
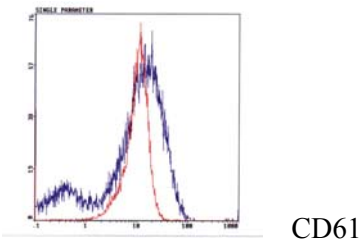
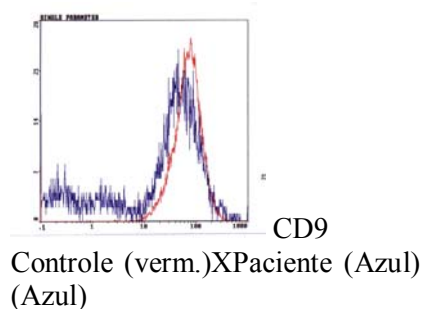
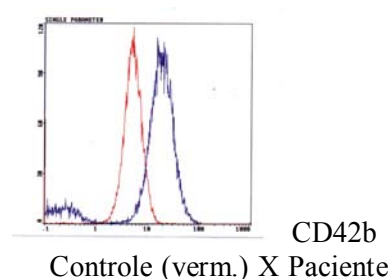
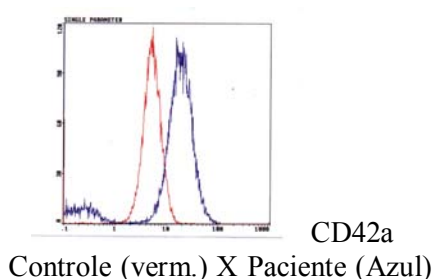
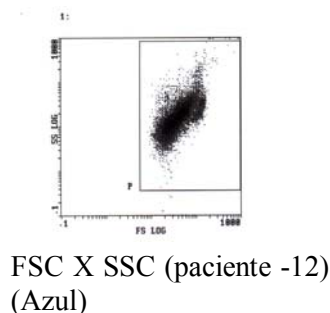
Data coleta	Média pico	MnX	MdX	Mínimo	Máximo	%
05/05/03	63,0 hetero	27,8	31,6	0,665	335,7	66,1

## CD61

Data coleta	Média pico	MnX	MdX	Mínimo	Máximo	%
05/05/03	76,0	13,5	14,4	0,810	140,3	99,7

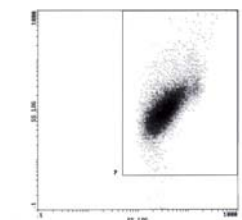
## CD41a

Data coleta	Média pico	MnX	MdX	Mínimo	Máximo	%
05/05/03	69,0	23,9	26,6	0,840	210,3	100

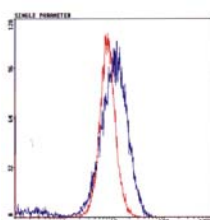


APÊNDICE 15 - CITOMETRIA DE FLUXO PACIENTE-13 (EG)-SBS  
CD9

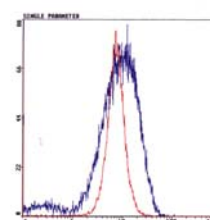
Data coleta	Média pico	MnX	MdX	Mínimo	Máximo	%
09/07/03	60,0 hetero	1,63	1,55	0,104	119,3	95,0
CD42a						
Data coleta	Média pico	MnX	MdX	Mínimo	Máximo	%
09/07/03	126,0	9,99	10,2	1,01	61,3	99,9
CD42b						
Data coleta	Média pico	MnX	MdX	Mínimo	Máximo	%
09/07/03	88	9,18	9,51	0,936	84,8	99,0
CD36						
Data coleta	Média pico	MnX	MdX	Mínimo	Máximo	%
09/07/03	89,0	8,62	8,79	0,715	145,4	98,2
CD61						
Data coleta	Média pico	MnX	MdX	Mínimo	Máximo	%
09/07/03	136,0	20,9	21,0	2,86	125,9	98,5
CD41a						
Data coleta	Média pico	MnX	MdX	Mínimo	Máximo	%
09/07/03	138,0	39,3	38,4	5,65	309,6	80,8



FSC X SSC (paciente-13) Controle (vermelho) X Paciente (Azul)

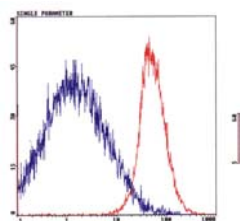


CD42a



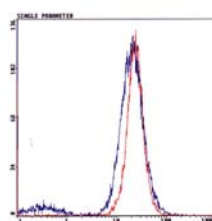
CD42b

Controle (verm.) X Paciente



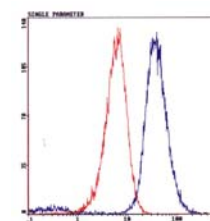
CD9

Controle (verm.) X Paciente (Azul)



CD61

Controle (verm. X Paciente (Azul)

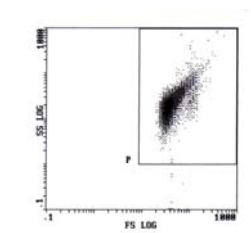


CD41a

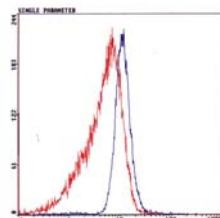
Controle (verm.) X Paciente

APÊNDICE 16 - CITOMETRIA DE FLUXO PACIENTE-14 (VS)-SBS  
CD9

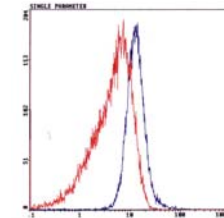
Data coleta	Média pico	MnX	MdX	Mínimo	Máximo	%
19/07/03	156,0	40,8	41,1	5,08	293,3	96,8
CD42a						
Data coleta	Média pico	MnX	MdX	Mínimo	Máximo	%
19/07/03	119,0	4,39	5,28	0,134	41,3	96,6
CD42b						
Data coleta	Média pico	MnX	MdX	Mínimo	Máximo	%
19/07/03	108,0	4,24	5,09	0,149	33,9	96,4
CD36						
Data coleta	Média pico	MnX	MdX	Mínimo	Máximo	%
19/07/03	55,0 hetero	7,32	8,97	0,104	183,7	88,2
CD61						
Data coleta	Média pico	MnX	MdX	Mínimo	Máximo	%
19/07/03	184,0	9,70	10,1	1,16	48,5	97,2
CD41a						
Data coleta	Média pico	MnX	MdX	Mínimo	Máximo	%
19/07/03	158,0	3,73	4,10	0,226	19,4	96,0



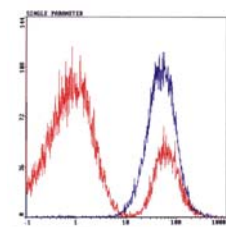
FSC X SSC (paciente-14)  
(vermelho)



CD42a

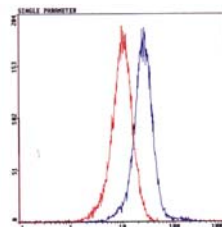


CD42b



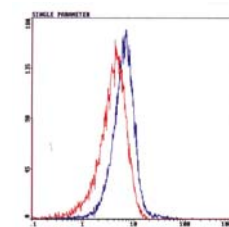
CD9

Control (azul)XPaciente (verm.)  
(Azul)



CD61

Control (azul)XPaciente (verm.)

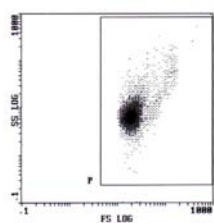


CD41

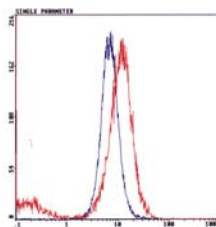
Control (verm.) X Paciente

APÊNDICE 17 - CITOMETRIA DE FLUXO PACIENTE-15 (BM)-SBS  
CD9

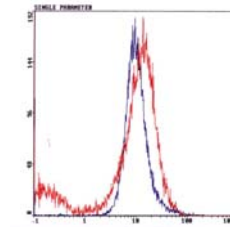
Data coleta	Média pico	MnX	MdX	Mínimo	Máximo	%
15/08/03	49,0	0,913	0,726	0,104	111,0	53,5
CD42a						
Data coleta	Média pico	MnX	MdX	Mínimo	Máximo	%
15/08/03	101,0	11,3	11,6	1,42	63,6	56,4
CD42b						
Data coleta	Média pico	MnX	MdX	Mínimo	Máximo	%
15/08/03	76,0	11,8	12,7	0,796	96,2	53,7
CD36						
Data coleta	Média pico	MnX	MdX	Mínimo	Máximo	%
15/08/03	54,0	6,40	6,67	0,456	145,4	55,2
CD61						
Data coleta	Média pico	MnX	MdX	Mínimo	Máximo	%
15/08/03	106,0	22,0	22,7	2,91	128,2	56,8
CD41a						
Data coleta	Média pico	MnX	MdX	Mínimo	Máximo	%
15/08/03	110,0	30,3	31,0	3,95	153,5	56,2



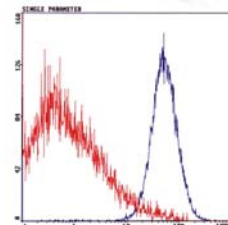
FSC X SSC (paciente-15)  
(vermelho)



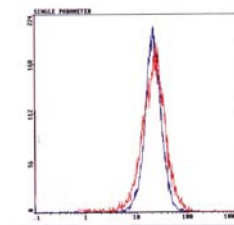
CD42a  
Controle (azul) X Paciente (vermelho)



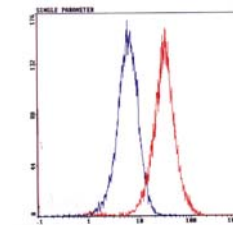
CD42b  
Controle (azul) X Paciente



CD9  
Controle (azul)XPaciente(vermelho)



CD61  
Controle (azul)XPaciente (verm.)



CD41a  
Control (azul)XPaciente (verm.)

APÊNDICE 18 - CITOMETRIA DE FLUXO PACIENTE-01 (EC)-TG  
CD9

Data coleta	Média pico	MnX	MdX	Mínimo	Máximo	%
13/05/03	93,0 hetero	53,0	49,7	2,52	979,0	95,5

CD42a

Data coleta	Média pico	MnX	MdX	Mínimo	Máximo	%
13/05/03	247,0	6,66	6,50	1,96	30,4	97,8

CD42b

Data coleta	Média pico	MnX	MdX	Mínimo	Máximo	%
13/05/03	234,0	10,9	10,7	1,79	50,3	98,4

CD36

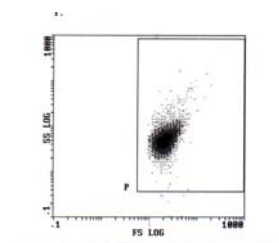
Data coleta	Média pico	MnX	MdX	Mínimo	Máximo	%
13/05/03	102,0	9,55	10,5	0,214	153,5	97,0

CD61

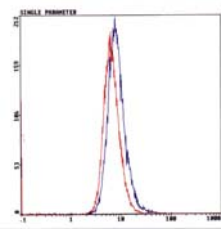
Data coleta	Média pico	MnX	MdX	Mínimo	Máximo	%
13/05/03	0	0	0	0	0	0

CD41a

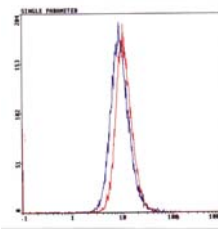
Data coleta	Média pico	MnX	MdX	Mínimo	Máximo	%
13/05/03	0	0	0	0	0	0



FSC X SSC (paciente-1) Controle (azul) X Paciente (vermelho)

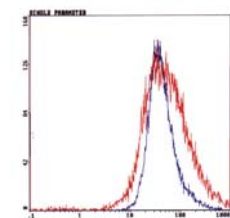


CD42a

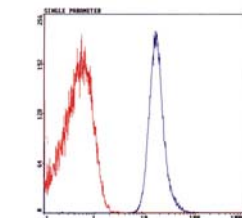


CD42b

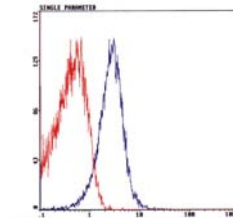
Controle (azul) X Paciente (vermelho)



CD9



CD61

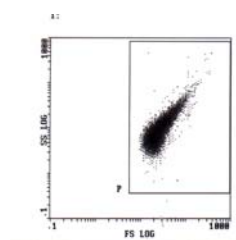


CD41a

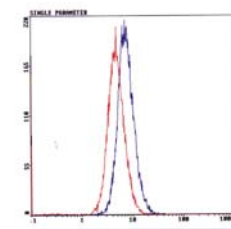
Controle (azul) X Paciente (vermelho) Controle (azul) X Paciente (verm.) Controle (azul) X Paciente (verm.)

APÊNDICE 19 - CITOMETRIA DE FLUXO PACIENTE-02 (EC)-TG  
CD9

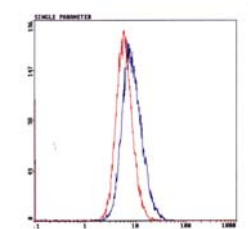
Data coleta	Média pico	MnX	MdX	Mínimo	Máximo	%
29/05/03	106,0 hetero	60,8	60,3	5,86	817,8	98,2
CD42a						
Data coleta	Média pico	MnX	MdX	Mínimo	Máximo	%
29/05/03	237,0	4,85	4,81	1,27	21,6	97,2
CD42b						
Data coleta	Média pico	MnX	MdX	Mínimo	Máximo	%
29/05/03	214,0	6,12	6,04	1,34	31,5	98,1
CD36						
Data coleta	Média pico	MnX	MdX	Mínimo	Máximo	%
29/05/03	134,0	20,2	21,9	1,23	162,0	96,0
CD61						
Data coleta	Média pico	MnX	MdX	Mínimo	Máximo	%
29/05/03	0	0	0	0	0	0
CD41a						
Data coleta	Média pico	MnX	MdX	Mínimo	Máximo	%
29/05/03	177,0	4,88	4,95	0,970	22,4	95,1



FSC X SSC (paciente-2) Controle (verm.) X Paciente (verm)

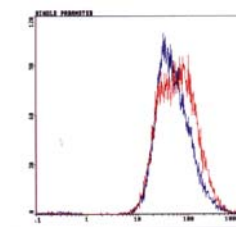


CD42a



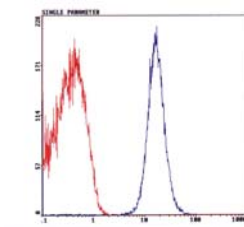
CD42b

Controle (verm.) X Paciente



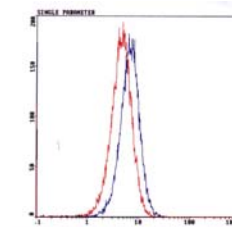
CD9

Controle (azul) X Paciente (verm)



CD61

Controle (azul) X Paciente (verm)



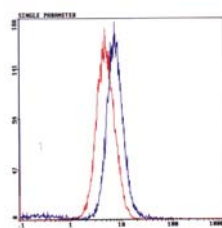
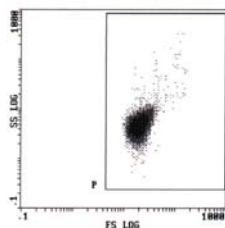
CD41a

Controle (azul) X Paciente

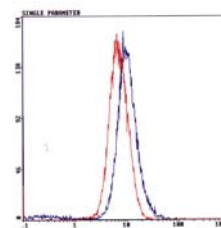
(verm)

APÊNDICE 20 - CITOMETRIA DE FLUXO PACIENTE-03 (JA)-TG  
CD9

Data coleta	Média pico	MnX	MdX	Mínimo	Máximo	%
04/09/03	104,0 hetero	112,2	110,4	5,17	996,7	96,3
CD42a						
Data coleta	Média pico	MnX	MdX	Mínimo	Máximo	%
04/09/03	208,0	4,97	4,94	1,01	23,2	99,0
CD42b						
Data coleta	Média pico	MnX	MdX	Mínimo	Máximo	%
04/09/03	204,0	7,25	7,20	1,61	32,1	98,7
CD36						
Data coleta	Média pico	MnX	MdX	Mínimo	Máximo	%
04/09/03	198,0	13,0	13,1	2,22	62,4	99,0
CD61						
Data coleta	Média pico	MnX	MdX	Mínimo	Máximo	%
04/09/03	112,0	9,35	9,96	0,296	130,5	98,2
CD41a						
Data coleta	Média pico	MnX	MdX	Mínimo	Máximo	%
04/09/03	0	0	0	0	0	0

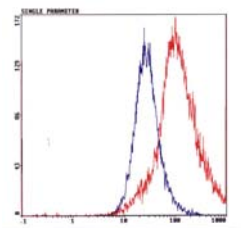


CD42a

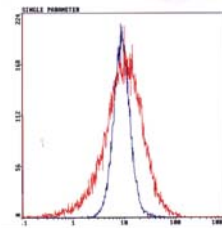


CD42b

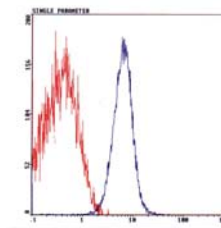
FSC X SSC (paciente- 3 TG) Controle (azul) X Paciente (vermelho) Controle (azul) X Paciente (verm.)



CD9



CD61



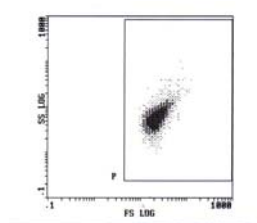
CD41a

Controle (azul)XPaciente (verm.) Controle (azul)XPaciente (vermelho)Controle (azul)XPaciente (verm.)

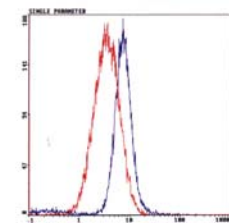


APÊNDICE 21 - CITOMETRIA DE FLUXO PACIENTE-04 (MF)-TG  
CD9

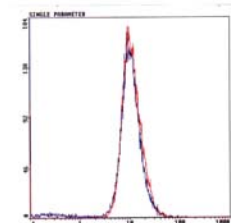
Data coleta	Média pico	MnX	MdX	Mínimo	Máximo	%
04/09/03	89,0 hetero	89,6	85,2	5,46	996,7	93,5
CD42a						
Data coleta	Média pico	MnX	MdX	Mínimo	Máximo	%
04/09/03	136,0	3,52	3,55	0,481	21,2	97,9
CD42b						
Data coleta	Média pico	MnX	MdX	Mínimo	Máximo	%
04/09/03	195,0	11,2	10,8	3,12	62,4	98,3
CD36						
Data coleta	Média pico	MnX	MdX	Mínimo	Máximo	%
04/09/03	132,0	6,78	6,92	0,374	70,8	97,2
CD61						
Data coleta	Média pico	MnX	MdX	Mínimo	Máximo	%
04/09/03	109,0	1,25	1,35	0,104	15,6	92,9
CD41a						
Data coleta	Média pico	MnX	MdX	Mínimo	Máximo	%
04/09/03	0	0	0	0	0	0



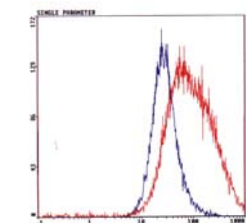
FSC X SSC (paciente-4 TG) Controle (azul) X Paciente (vermelho)  
(verm.)



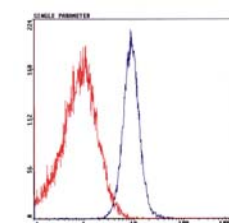
CD42a



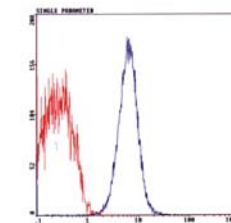
CD42b



CD9



CD61

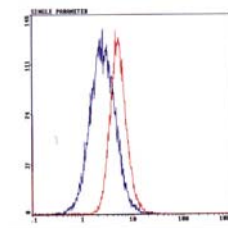
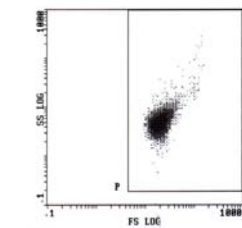


CD41a

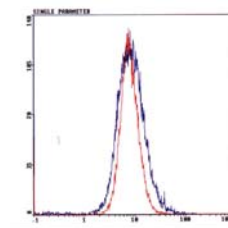
Controle (azul)XPaciente (verm.)Controle (azul)XPaciente (vermelho) C ontrole (azul)XPaciente  
(verm.)

APÊNDICE 22 - CITOMETRIA DE FLUXO PACIENTE-05 (AK)-TG  
CD9

Data coleta	Média pico	MnX	MdX	Mínimo	Máximo	%
29/09/03	112,0 hetero	47,0	47,4	4,17	405,5	98,5
CD42a						
Data coleta	Média pico	MnX	MdX	Mínimo	Máximo	%
29/09/03	225,0	5,27	5,22	1,34	24,1	97,7
CD42b						
Data coleta	Média pico	MnX	MdX	Mínimo	Máximo	%
29/09/03	214,0	8,04	7,87	1,96	45,2	98,4
CD36						
Data coleta	Média pico	MnX	MdX	Mínimo	Máximo	%
29/09/03	121,0	5,46	5,92	0,144	91,1	97,7
CD61						
Data coleta	Média pico	MnX	MdX	Mínimo	Máximo	%
29/09/03	223,0	15,5	15,5	3,07	78,9	98,4
CD41a						
Data coleta	Média pico	MnX	MdX	Mínimo	Máximo	%
29/09/03	180,0	4,74	4,86	0,665	24,9	97,7

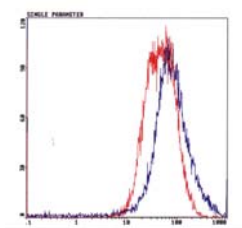


CD42a

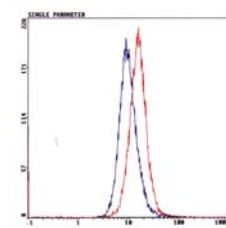


CD42b

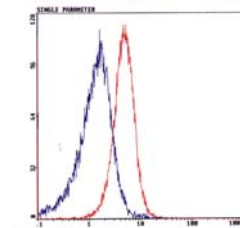
FSC X SSC (paciente-5 TG) Controle (azul) X Paciente (vermelho) Controle (azul) X Paciente (vermelho)



CD9



CD61



CD41a

Controle (azul) X Paciente (verm.) Controle (azul) X Paciente (vermelho) Controle (Azul)x Pac. (verm.)

APÊNDICE 23 - CD42A NORMALIDADE- ADULTO

Nº	Média pico	MnX	MdX	Mínimo	Máximo	%
1	248,0	8,03	7,95	2,07	31,0	94,4
2	161,0	6,32	6,35	0,754	81,8	96,7
3	224,0	5,79	5,75	1,23	31,5	98,3
4	212,0	5,28	5,26	1,06	20,5	98,2
5	227,0	5,45	5,38	1,16	31,5	96,9
6	212,0	8,37	8,12	2,26	56,1	98,5
7	233,0	6,62	6,58	1,76	25,4	97,8
8	136,0	8,84	8,91	2,07	32,1	88,6
9	159,0	3,90	3,75	0,630	67,1	97,7
10	228,0	7,36	7,29	1,92	31,0	98,5
11	217,0	7,57	7,46	2,03	32,1	97,4
12	244,0	7,35	7,24	1,73	27,7	97,1
13	239,0	6,48	6,39	1,79	28,3	97,0
14	234,0	9,16	9,06	2,66	42,0	97,4
15	241,0	11,6	11,4	3,07	54,1	95,7
16	215,0	7,03	6,99	1,61	42,0	97,7
17	223,0	8,80	8,72	2,22	40,2	97,1
18	188,0	7,62	7,55	2,03	35,7	82,8
19	225,0	3,86	3,86	1,01	17,7	97,1
20	220,0	4,93	4,93	1,25	20,7	98,0
21	255,0	6,09	6,01	1,96	23,4	97,4
22	177,0	8,19	7,85	2,47	68,3	94,1
23	204,0	3,25	3,13	0,702	38,3	95,5
24	209,0	6,17	6,09	1,39	33,9	98,7
25	171,0	6,45	6,47	0,970	37,1	95,9
26	163,0	4,09	4,09	0,782	24,5	98,3
27	203,0	3,04	3,03	0,566	16,2	99,1
28	224,0	5,80	5,76	1,69	32,1	98,2
29	230,0	4,08	4,09	1,02	16,8	96,0
30	196,0	4,02	4,03	0,741	19,7	96,1
31	220,0	4,61	4,55	1,20	26,3	98,0
32	234,0	7,46	7,41	1,89	32,1	98,2
33	205,0	5,68	5,76	1,04	26,3	92,8
34	201,0	3,26	3,28	0,597	12,6	99,1

APÊNDICE 24 - CD42B NORMALIDADE ADULTO

Nº	Média pico	MnX	MdX	Mínimo	Máximo	%
1	168,0	13,3	12,7	1,47	121,5	99,3
2	193,0	5,27	5,31	0,919	24,5	97,0
3	207,0	12,5	12,2	2,61	84,8	98,5
4	225,0	6,84	6,84	1,29	30,4	98,5
5	201,0	8,35	8,22	2,03	44,4	98,2
6	203,0	9,12	8,89	2,10	65,9	98,6
7	214,0	7,70	7,67	1,66	31,0	96,2
8	158,0	14,3	13,4	3,01	190,5	95,8
9	138,0	15,0	14,7	2,03	174,1	98,6
10	203,0	8,79	8,66	2,03	40,5	98,4
11	193,0	8,71	8,45	2,03	49,4	98,1
12	213,0	8,14	7,99	1,99	40,5	96,8
13	207,0	6,64	6,60	1,01	35,7	98,1
14	193,0	8,28	8,25	1,73	41,3	97,4
15	201,0	13,2	13,0	2,75	84,8	97,1
16	191,0	10,4	9,88	2,03	111,0	97,2
17	204,0	12,7	12,5	3,07	64,1	97,3
18	183,0	10,6	10,4	1,96	56,1	85,6
19	235,0	4,67	4,66	0,988	20,8	97,2
20	206,0	3,32	3,33	0,702	15,2	97,3
21	220,0	7,21	7,05	1,89	41,7	92,1
22	174,0	6,05	5,92	1,69	31,5	95,5
23	143,0	10,9	10,8	1,66	64,7	97,1
24	177,0	10,4	9,93	1,58	103,3	99,1
25	159,0	10,4	10,3	2,10	68,3	97,0
26	169,0	7,44	7,57	0,619	46,8	98,0
27	216,0	7,71	7,53	1,99	37,9	99,4
28	207,0	12,5	12,2	2,96	72,1	98,5
29	221,0	7,06	6,95	1,29	45,2	96,4
30	150,0	4,70	4,64	0,988	24,5	93,4
31	204,0	9,54	9,01	2,03	96,2	97,7
32	209,0	8,81	8,77	1,76	46,0	98,4
33	176,0	9,48	9,33	1,89	59,2	87,2
34	194,0	6,23	6,04	1,47	28,3	99,0

APÊNDICE 25 - CD61 NORMALIDADE ADULTO

Nº	Média pico	MnX	MdX	Mínimo	Máximo	%
1	202,0	9,81	10,3	1,16	65,9	98,6
2	183,0	10,4	10,5	1,49	91,1	97,0
3	223,0	16,0	15,8	3,12	87,9	98,4
4	198,0	9,87	10,7	0,970	45,2	98,2
5	217,0	7,35	7,32	1,39	31,0	98,8
6	256,0	17,7	17,3	5,97	78,9	98,1
7	231,0	12,2	12,3	2,52	45,2	98,2
8	193,0	10,9	11,0	2,10	46,0	91,8
9	177,0	8,19	8,06	1,69	81,8	98,0
10	211,0	8,44	8,45	1,82	35,7	98,6
11	226,0	17,3	17,1	3,61	78,9	97,8
12	207,0	7,58	7,58	1,58	40,5	98,2
13	191,0	6,44	6,52	1,06	32,7	98,3
14	214,0	13,0	13,3	2,38	59,2	97,6
15	203,0	25,3	25,8	4,02	201,0	97,3
16	222,0	21,6	21,7	4,72	77,5	97,5
17	240,0	22,1	21,9	5,97	100,6	97,1
18	224,0	9,04	9,02	1,96	42,8	98,8
19	272,0	14,0	14,0	3,95	53,1	97,8
20	190,0	6,65	6,86	0,970	30,7	96,4
21	204,0	11,1	11,2	2,18	53,6	97,9
22	182,0	15,8	15,8	4,17	57,1	95,9
23	184,0	13,9	13,5	2,34	81,8	96,5
24	202,0	11,5	11,5	2,26	61,3	98,4
25	152,0	15,4	15,7	3,01	86,3	97,0
26	182,0	11,9	11,8	2,26	86,3	98,1
27	198,0	7,29	7,29	1,49	33,9	99,4
28	223,0	16,0	15,8	3,18	87,9	98,4
29	235,0	19,8	19,6	5,26	81,8	96,8
30	197,0	15,4	15,4	3,81	62,4	96,9
31	201,0	6,76	6,77	1,02	69,6	97,9
32	217,0	19,0	19,0	3,81	86,3	98,6
33	229,0	9,89	9,82	2,96	40,5	90,7
34	214,0	5,28	5,36	0,953	21,2	99,2

APÊNDICE 26 - CD41A NORMALIDADE ADULTO

Nº	Média pico	MnX	MdX	Mínimo	Máximo	%
1	164,0	8,27	8,50	1,14	55,1	92,1
2	108,0	3,50	3,81	0,142	51,2	94,6
3	211,0	6,22	6,29	0,970	35,1	98,3
4	138,0	3,23	3,57	0,203	19,9	97,2
5	175,0	4,88	4,99	0,796	23,2	98,4
6	169,0	2,63	2,74	0,292	20,1	97,3
7	197,0	7,20	7,42	0,953	29,9	97,5
8	179,0	6,57	6,76	0,871	30,4	90,4
9	155,0	2,98	3,13	0,182	31,0	97,2
10	178,0	4,96	5,07	0,665	24,5	98,5
11	200,0	6,71	6,80	1,01	31,0	97,4
12	182,0	5,80	5,89	1,08	27,8	97,9
13	158,0	2,96	3,11	0,210	27,8	98,4
14	177,0	5,38	5,68	0,576	26,8	97,5
15	178,0	6,18	6,41	0,526	47,7	96,6
16	174,0	5,82	6,01	0,768	26,3	97,5
17	203,0	7,38	7,47	1,58	31,2	96,7
18	206,0	6,34	6,43	1,14	28,3	98,8
19	192,0	4,19	4,33	0,641	20,8	97,8
20	163,0	5,21	5,69	0,342	30,4	95,9
21	174,0	4,14	4,35	0,448	20,5	97,5
22	161,0	7,67	7,79	1,20	33,9	96,1
23	144,0	8,32	8,06	1,20	78,9	95,2
24	154,0	6,08	6,21	0,641	59,2	98,7
25	131,0	11,2	11,6	1,49	70,8	96,5
26	149,0	6,40	6,59	0,641	58,4	96,9
27	158,0	2,71	2,83	0,238	15,3	98,6
28	211,0	6,23	6,29	1,27	29,9	98,1
29	208,0	9,42	9,43	1,92	37,7	96,6
30	176,0	7,39	7,49	1,29	31,0	96,9
33	162,0	2,74	2,85	0,214	37,7	96,4
32	180,0	5,25	5,47	0,536	25,4	98,5
33	185,0	5,65	5,77	0,988	22,8	90,6
34	152,0	2,32	2,47	0,207	11,7	97,8

APÊNDICE 2 7- CD42A NORMALIDADE CRIANÇA

Nº	Média pico	MnX	MdX	Mínimo	Máximo	%
1	207,0	6,17	5,85	1,27	64,7	96,8
2	192,0	4,06	4,0	0,903	20,5	99,1
3	227,0	5,47	5,31	0,732	73,4	97,3
4	220,0	4,61	4,55	1,20	26,8	98,0
5	145,0	2,58	2,58	0,381	29,9	98,0
6	212,0	8,39	8,12	1,92	76,1	98,6
7	188,0	5,33	5,26	1,06	31,0	95,6
8	238,0	5,71	5,62	1,27	25,4	98,4
9	207,0	4,71	4,43	1,04	59,2	98,3
10	149,0	2,87	2,88	0,597	13,5	92,2
11	168,0	3,83	3,84	0,988	14,0	90,5
12	190,0	2,71	2,71	0,546	15,1	90,6
13	184,0	3,50	3,58	0,586	18,0	99,0
14	133,0	2,99	3,10	0,342	15,1	96,3
15	225,0	7,44	7,43	1,66	31,0	97,6

APÊNDICE 28 - CD42B NORMALIDADE CRIANÇA

Nº	Média pico	MnX	MdX	Mínimo	Máximo	%
1	172,0	7,27	7,18	1,06	41,3	96,7
2	148,0	12,7	12,2	2,10	117,2	99,5
3	201,0	8,36	8,22	1,34	96,2	98,5
4	204,0	9,55	9,02	2,38	94,4	97,6
5	139,0	8,64	8,44	1,25	86,3	94,8
6	203,0	9,11	8,89	1,63	65,9	98,7
7	197,0	5,10	5,00	1,02	29,9	95,8
8	146,0	16,1	15,9	2,47	142,8	98,9
9	162,0	16,5	16,3	2,96	137,8	98,9
10	158,0	9,55	9,86	1,44	42,8	95,9
11	145,0	11,2	11,3	2,07	60,2	93,8
12	127,0	12,4	13,1	1,34	92,8	88,0
13	209,0	6,73	6,58	1,44	37,1	99,0
14	143,0	6,19	6,08	0,953	68,3	95,6
15	214,0	7,56	7,53	1,34	39,1	96,7



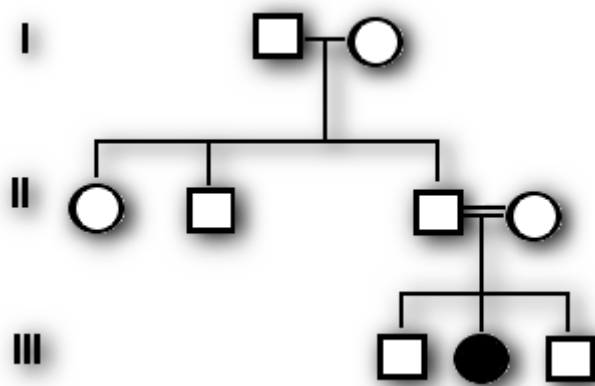
APÊNDICE 29 - CD61 NORMALIDADE CRIANÇA

Nº	Média pico	MnX	MdX	Mínimo	Máximo	%
1	222,0	7,07	7,09	1,37	32,1	99,2
2	191,0	11,8	11,0	2,47	92,8	99,5
3	217,0	7,36	7,32	0,903	46,0	99,1
4	201,0	6,74	6,77	1,06	54,1	97,7
5	225,0	9,99	9,61	2,30	78,9	98,2
6	256,0	17,8	17,3	5,08	97,9	98,2
7	144,0	9,80	9,75	1,01	190,5	91,5
8	175,0	19,1	17,8	4,48	132,9	98,8
9	210,0	17,3	16,9	3,42	105,2	98,6
10	119,0	12,7	12,5	2,03	80,3	93,9
11	130,0	6,64	6,68	1,69	32,1	99,9
12	131,0	15,7	16,0	1,61	128,2	95,5
13	223,0	7,67	7,64	1,44	35,1	99,3
14	158,0	14,9	14,8	3,12	86,3	96,2
15	222,0	27,89	24,1	4,64	103,3	97,0

APÊNDICE 30 - CD41A NORMALIDADE CRIANÇA

Nº	Média pico	MnX	MdX	Mínimo	Máximo	%
1	179,0	5,36	5,60	0,653	25,9	99,0
2	139,0	3,25	3,24	0,296	31,0	98,8
3	175,0	4,84	4,98	0,342	43,6	99,1
4	162,0	2,74	2,85	0,203	37,1	96,4
5	128,0	1,31	1,43	0,118	14,8	90,8
6	169,0	2,61	2,74	1,92	21,2	97,7
7	111,0	3,32	3,49	0,125	101,5	91,2
8	153,0	10,3	9,64	2,10	105,2	99,0
9	171,0	6,72	6,58	1,10	59,2	98,7
10	108,0	8,11	8,32	0,887	41,3	94,0
11	113,0	11,0	11,3	2,07	48,5	100
12	122,0	11,1	11,7	0,641	125,9	97,6
13	160,0	2,61	2,77	0,176	18,7	98,00
14	103,0	2,76	3,06	0,129	20,1	94,3
15	166,0	5,81	6,05	0,689	30,4	97,1

FIGURA 11 - HEREDOGRAMA DE DOENÇA AUTOSSÔMICA RECESSIVA



## **ANEXOS**

ANEXO 1- APROVAÇÃO DA PESQUISA PELO COMITÊ DE ÉTICA

ANEXO 2- TERMO DE CONSENTIMENTO